

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de Biologie Animale
Département de Biochimie Médicale
Département de Biochimie

FACULTE DES SCIENCES

Prof. H.J. Huggel
Prof. S. Rous
Prof. J. Deshusses

Un nouveau paramètre de régulation du système β -oxydatif dans le coeur

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève pour
obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

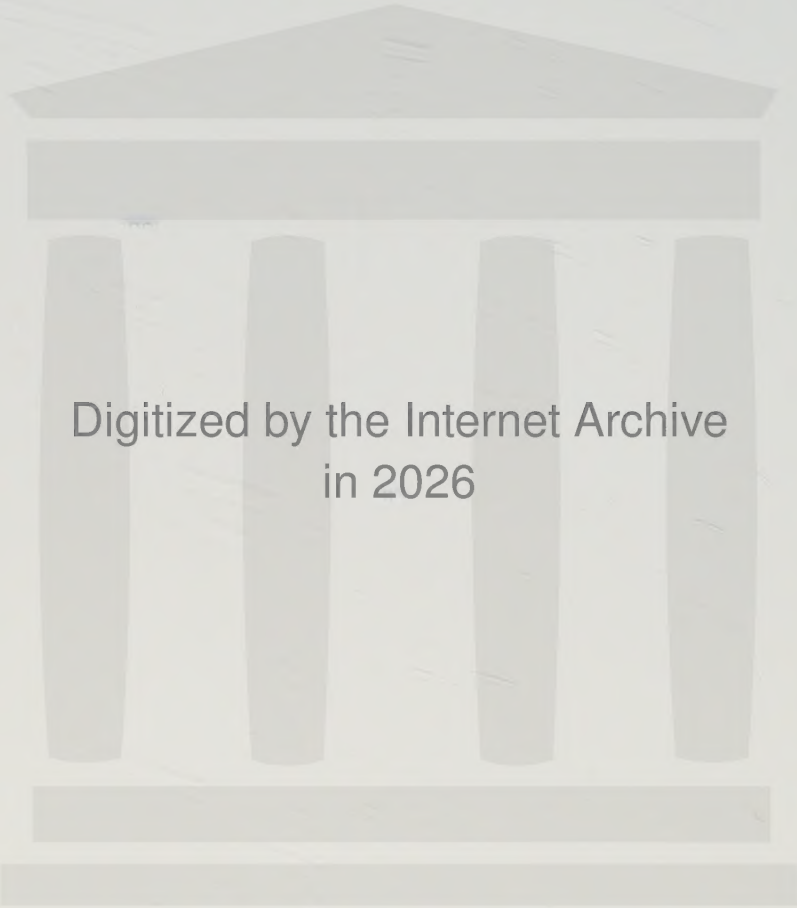
Nestor FOURNIER
de
Nendaz, Valais

Thèse No 1880



Juris Druck + Verlag Zurich

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545901_0045

UNIVERSITE DE GENEVE

Département de Biologie Animale
Département de Biochimie Médicale
Département de Biochimie

FACULTE DES SCIENCES

Prof. H.J. Huggel
Prof. S. Rous
Prof. J. Deshusses

Un nouveau paramètre de régulation du système β -oxydatif dans le coeur

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Genève pour
obtenir le grade de docteur ès sciences biologiques

par

Nestor FOURNIER
de
Nendaz, Valais


Thèse No 1880



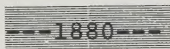
Juris Druck + Verlag Zurich
1978

La faculté des sciences, sur le préavis de Monsieur H. HUGGEL, professeur ordinaire et de Mademoiselle S. ROUS, professeur ordinaire (Faculté de Médecine) codirecteurs de thèse et de Monsieur J. DESHUSSES, professeur ordinaire (Dpt. de Biochimie).....

autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

GENÈVE, le 15 août 1978

Thèse



Le Doyen :

B. Levrat

Bernard LEVRAT



à KARINESTOR
N
S
E
L
M
E

Je remercie les professeurs S. Rous et H.J. Huggel pour avoir accepté d'être directeur et co-directeur de cette thèse ; ainsi que M. Geoffroy et J. Deshusses pour leurs contributions scientifiques de très haute qualité.

RESUME

L'énergie nécessaire à la contraction du muscle cardiaque est produite essentiellement par le catabolisme des acides gras à travers le système β -oxydatif localisé exclusivement dans les mitochondries. Ces acides gras pratiquement insolubles dans les milieux biologiques aqueux, parviennent au coeur par le système circulatoire, véhiculés par l'albumine qui possède des sites hydrophobiques capables de se lier aux acides gras. A cause de son poids moléculaire élevé, l'albumine reste confinée dans le système circulatoire. Comment les acides gras parviennent-ils aux mitochondries à travers le cytoplasme ?

La présente étude concerne la purification pour la première fois à partir du muscle cardiaque, d'une protéine FABP de faible poids moléculaire (12'000 daltons) et de pI 5.0, capable de se lier aux acides gras et de les céder au système β -oxydatif mitochondrial. Ces propriétés font de FABP le translocateur physiologique probable des acides gras à travers le cytoplasme dans les cellules cardiaques. La vitesse de la β -oxydation est efficacement contrôlée par la concentration en protéine FABP dans le milieu d'incubation. Le mécanisme de cette régulation a été investigué, en prenant l'albumine comme modèle de véhicule et un analogue d'acide gras sous la forme d'acide stéarique "spin-labeled" porteur d'un radical paramagnétique stable du type nitroxyde ($>NO\cdot$). La double information d'environnement et de cinétique contenue dans les signaux de résonance paramagnétique électronique (RPE) nous a permis de montrer que les acides gras sont réversiblement échangés entre les sites de liaison sur la protéine véhicule et la phase lipidique des membranes mitochondriales. Ce dernier compartiment apparaît comme le réel réservoir alimentant en substrat (acides gras) le système β -oxydatif et son contenu (S) en acides gras, contrôlé par la protéine véhicule, conditionne la vitesse V de la β -oxydation.

Ce type de protéine (FABP), porteur de sites hydrophobiques véhiculant les acides gras et capable de les céder au système enzymatique β -oxydant mitochondrial, apparaît donc comme très important dans la régulation de la production d'énergie dans le coeur.

TABLE DES MATIERES

p.	chap.	
1	1	: <u>PLAN GENERAL</u>
3	2	: <u>ABREVIATIONS ET DEFINITIONS</u>
5	3	: <u>INTRODUCTION</u>
9	4	: <u>MATERIEL ET METHODES</u>
9	4-1	: Isolement des mitochondries du coeur de rats
9	4-2	: Technique de "spin-labeling"
9	4-2a	: Principe physico-chimique
11	4-2b	: Quelques exemples de spectres RPE de l'acide stéarique "spin-labeled"
13	4-2c	: Application à l'étude de la distribution d'un acide gras "spin-labeled" entre deux compartiments (a) et (b)
15	4-3	: Technique de "mixing-flow"
16	4-4	: Définition d'un paramètre empirique h'/h indicateur de la mobilité de la molécule d'acide stéarique "spin-labeled"
16	4-5	: Dosage des protéines.
17	4-6	: Milieu d'incubation pour l'étude de la β -oxydation des acides gras, par les mitochondries cardiaques.
17	4-7	: Méthodes de mesure de la β -oxydation de l'acide stéarique
17	4-7a	: Acide stéarique (1 - C ¹⁴)
17	4-7b	: Acide stéarique "spin-labeled"
18	4-8	: Isolement et délipidation du surnageant après homogénéisation de coeur de rats
18	4-9	: Filtration de surnageant de coeur de rats, à travers des gels de Séphadex G-75
18	4-10	: Isolement de la protéine FABP par chromatographie sur cellulose DE52
19	4-11	: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
19	4-12	: "Isoelectric-focusing"
19	4-13	: Microscopie électronique
19	4-14	: Liposomes
20	4-15	: Origine des réactifs
22	5	: <u>RESULTATS</u>
22	5-1	: <u>Régulation, in vitro, du système β-oxydatif mitochondrial par l'albumine, utilisé en tant que modèle de transporteur d'acides gras.</u>
22	5-1a	: Introduction
22	5-1b	: liaison de l'acide stéarique à l'albumine, visualisée par "spin-labeling"
23	5-1c	: Echange d'acide stéarique "spin-labeled" entre l'albumine et les membranes mitochondriales
23	5-1c-1	: Caractérisation du signal de RPE dû à l'acide stéarique "spin-labeled" lié aux membranes mitochondriales

p. chap.

- 23 5-1c-2 : Environnement de l'acide stéarique "spin-labeled", dans les membranes mitochondriales
- 26 5-1c-3 : Cinétique du transfert de l'acide stéarique "spin-labeled" de l'albumine vers les membranes mitochondriales.
- 26 5-1c-4 : Réversibilité et partition de l'acide stéarique "spin-labeled" entre l'albumine et les membranes mitochondriales
- 26 5-1d : Contrôle du système β -oxydatif par l'albumine, dans les mitochondries isolées
- 26 5-1d-1 : Introduction
- 27 5-1d-2 : Justification de l'emploi d'acides gras "spin-labeled" dans l'étude de la β -oxydation; mesure de leur vitesse de β -oxydation
- 28 5-1d-3 : Cinétique de β -oxydation de l'acide stéarique "spin-labeled", préalablement lié à l'albumine
- 38 5-1d-4 : Cinétique de β -oxydation de l'acide stéarique "spin-labeled" préalablement lié aux membranes mitochondriales
- 40 5-1e : Conclusions
- 42 5-2 : Evidences, in vitro, d'un contrôle du système β -oxydatif mitochondrial, par des protéines se liant aux acides gras dans le coeur de rats
- 42 5-2a : Introduction
- 42 5-2b : Détection de protéines se liant aux acides gras dans le surnageant de coeur de rat
- 43 5-2c : Purification et caractérisation de la protéine (FABP) se liant aux acides gras dans le pic B.
- 43 5-2d : Cinétique de β -oxydation des acides gras liés à la protéine FABP
- 44 5-2e : Conclusions
- 53 6 : DISCUSSION
- 55 7 : BIBLIOGRAPHIE

2 - ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

2 - ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

- "SPIN-LABELED" : Portant un radical paramagnétique du type $>\text{NO}\cdot$
- SSA : Acide stéarique "spin-labeled" :
 - 1° : acide stéarique 12 - nitroxyde $\rightarrow$ 2 - (10 - carboxy decyl) - 2 - hexyl - 4,4 - dimethyl - 3 - oxazolidinyloxy.
 - 2° : acide stéarique 5 - nitroxyde $\rightarrow$ 2 - (3 - carboxy - propyl) - 4,4 - dimethyl - 2 tridecyl - 3 - oxazolidinyloxy.
- RPE : Résonance paramagnétique électronique
- A_{iso} : Distance en gauss (G), séparant deux pics dans un signal de RPE représentatif d'un mouvement isotrope.
- $2T_{//}$: Séparation des pics extrêmes dans un signal de RPE du type anisotrope.
- P : Distribution des acides gras entre 2 compartiments exprimée en % des contributions respectives.
- pI : Point isoélectrique
- PM : Poids moléculaire
- β -OXYDATION : Dégradation des acides gras, qui débute par l'oxydation du carbone en position β sur la chaîne d'acide gras et aboutit à la libération de composés à 2 atomes de carbone (Acétate)
- SYSTEME β -OXYDATIF : Ensemble des transformations chimiques et physico-chimiques et des transports aboutissant au catabolisme des acides gras en Acetyl-CoA
- FABP : "Fatty acid binding protein", protéine isolée de la muqueuse intestinale et capable de se lier aux acides gras
- Z : Idem, mais isolée du foie
- g.av. : Force de centrifugation, par rapport à la distance moyenne du tube de centrifugation à l'axe du rotor

3 - INTRODUCTION

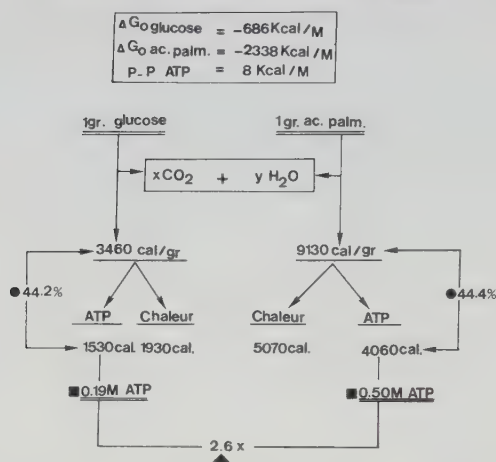


Fig. 1 : RENDEMENT ENERGETIQUE LORS DE L'OXYDATION BIOLOGIQUE DU GLUCOSE ET DE L'ACIDE PALMITIQUE.

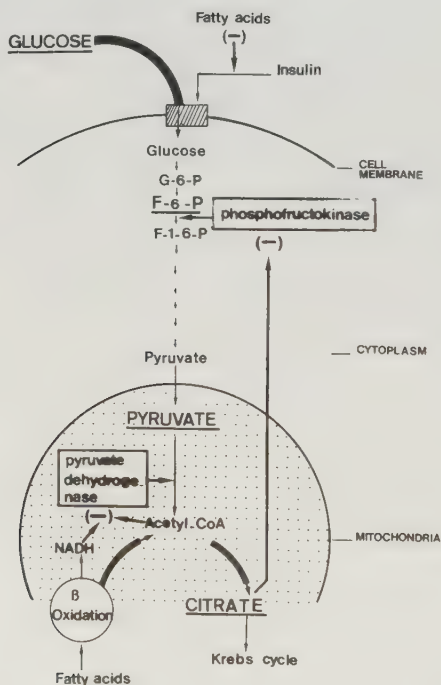


Fig. 2 : INTERACTION DU METABOLISME DU GLUCOSE ET DES ACIDES GRAS DANS LES CELLULES CARDIAQUES.

3 - INTRODUCTION

L'énergie nécessaire à la contraction cardiaque est fournie préférentiellement par l'oxydation des acides gras à chaîne longue. Dans le coeur de rat, normalement oxygéné et normalement approvisionné en substrat, il a été estimé (1) que plus de 80 % de l'énergie nécessaire à la contraction cardiaque provenait du catabolisme des acides gras. La densité d'électrons disponibles par unité de carbone étant plus forte dans les acides gras que dans les sucres, 2.6 fois plus d'énergie (ATP) est libérée par l'oxydation de 1 gr d'acide gras comparée à l'oxydation de 1 gr de glucose (Fig. 1).

Cette orientation préférentielle est contrôlée par une série de mécanismes de blocage du système glycolytique et de son approvisionnement en glucose (Fig. 2). La sensibilisation des membranes cellulaires cardiaques par l'insuline est inhibée par les acides gras selon un mécanisme inconnu (2). L'entrée du glucose dans les cellules étant inhibée, les substrats glycolytiques importants tels que G-6-P et F-1-6-diP ont des concentrations déplacées d'un ordre de grandeur par rapport aux concentrations d'équilibre, dans le sens défavorable à la glycolyse (3). L'acetyl-CoA et le NADH produit massivement par la β -oxydation des acides gras, sont d'autre part inhibiteurs de la pyruvate dehydrogenase (4); de même que le citrate s'accumulant dans le coeur durant le catabolisme des acides gras (4,5) est inhibiteur de la phosphofructokinase (6,7). Ainsi dans un coeur normal, la voie glycolytique est freinée par les acides gras ou par des produits (NADH, citrate) formés au cours du catabolisme de ces acides gras (Fig. 2).

Le système β -oxydatif, peut être subdivisé en 4 groupes de réactions enzymatiques ou physico-chimiques (Fig. 3) :

1° - La translocation des acides gras entre les membranes cellulaires et les mitochondries, siège exclusif de la β -oxydation, est assurée probablement par des protéines de faible poids moléculaire purifiées récemment à partir du foie (8), de la muqueuse intestinale (9) et du coeur (présent travail).

2° - L'activation des acides gras en acyl-CoA est effectuée dans la membrane externe des mitochondries sous l'action de l'enzyme : acyl-CoA synthétase.

3° - L'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale nécessite la transformation de l'acyl-CoA en acyl-carnitine qui migre à travers la membrane interne, probablement par électrophorèse transmembranaire selon Levitsky et coll. (10).

4° - Après reconversion des acyl-carnitine en acyl-CoA, les acides gras, subissent la β -oxydation dans la matrice mitochondriale.

Ces 4 opérations : translocation, activation, transport et β -oxydation, aboutissent finalement à la production d'acétyl CoA qui entre dans le cycle de Krebs et à la production de NADH et FADH_2 (Fig.3)

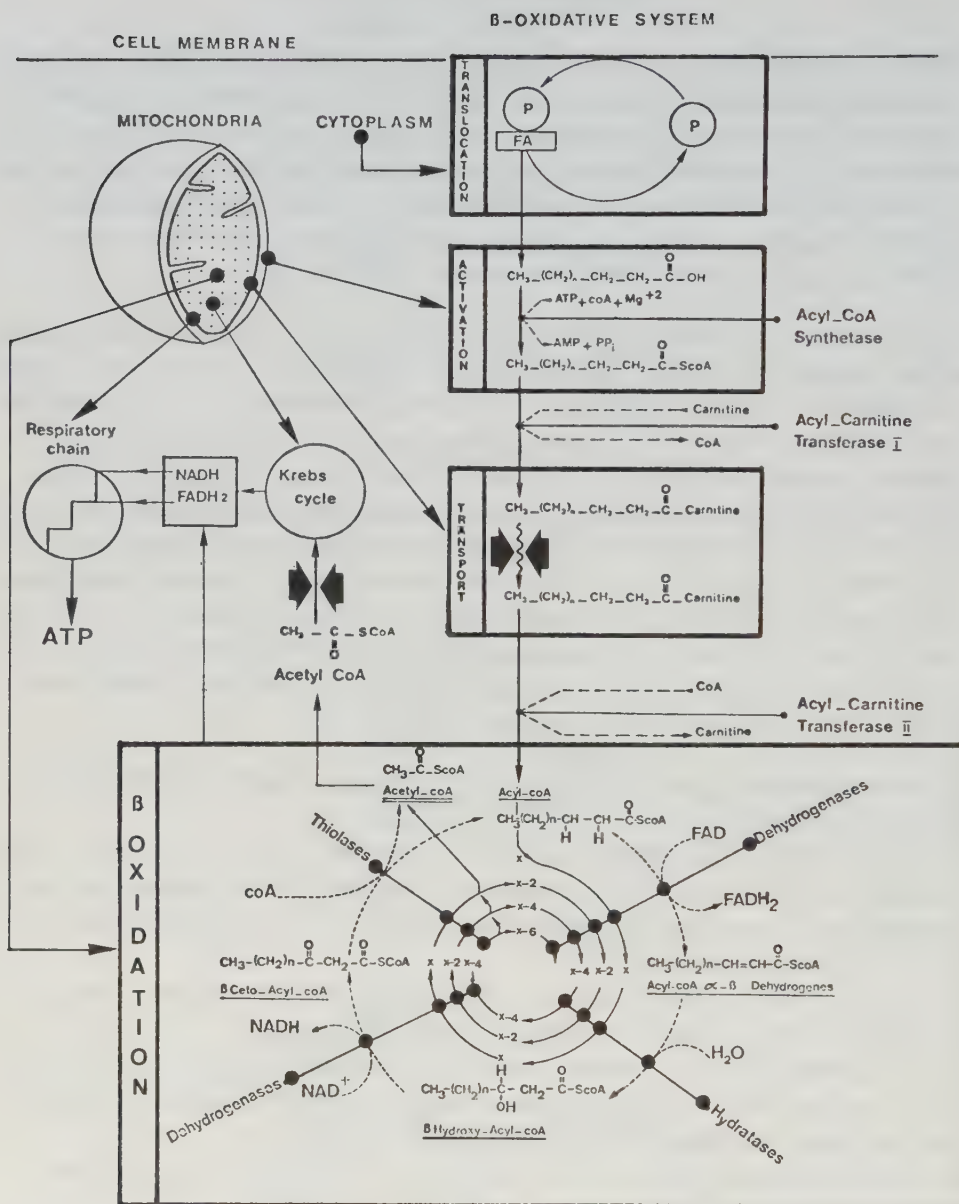


Fig. 3 : LE SYSTEME β-OXYDATIF

Dans le coeur sous faible pression ventriculaire, la vitesse des processus se déroulant dans les 4 blocs opérationnels du système β -oxydatif décrit ci-dessus, n'est jamais limitative; postérieurement à ces 4 systèmes, c'est la vitesse d'entrée de l'acetyl-CoA dans le cycle de Krebs qui est l'opération la plus limitante (11).

Sous forte pression ventriculaire, un mécanisme encore inconnu de couplage mécano-chimique, accélère la vitesse d'utilisation de l'acetyl-CoA par le cycle de Krebs et l'opération la plus limitante se situe alors dans la translocation des acides gras sous forme d'acyl-carnitine à travers la membrane interne des mitochondries (Fig. 3 et réf. 11).

Ces mécanismes de régulation de la production d'énergie à travers le catabolisme des acides gras, observés quasiment in vivo sur des coeurs perfusés ou parfois avec des milieux in vitro sur des mitochondries isolées, résultent essentiellement de l'étude des 3 compartiments : activation, transport et β -oxydation (Fig. 3). Le premier compartiment: translocation transcytoplasmique des acides gras n'a été que très peu étudié sous l'angle d'une régulation possible du système β -oxydatif. Jusqu'à maintenant, in vitro, un "translocateur" modèle, mais non physiologique par rapport au cytoplasme, a toujours été utilisé pour véhiculer les acides gras dans des milieux aqueux : c'est l'albumine. De nombreux auteurs (12-18) ont signalé l'importance du rapport molaire $\bar{v}$ = acide gras/albumine, sur la vitesse de la β -oxydation dans les mitochondries isolées, mais aucun mécanisme n'a été proposé.

Le travail qui sera présenté ci-après, concerne l'étude de ce mécanisme dans les mitochondries cardiaques isolées, en utilisant le "translocateur" modèle qu'est l'albumine, puis un "translocateur" physiologique : la protéine FABP, purifiée pour la première fois à partir du muscle cardiaque. Il sera démontré que cette protéine en variant sa concentration est capable de moduler la vitesse du catabolisme des acides gras.

4 - MATERIEL ET METHODES

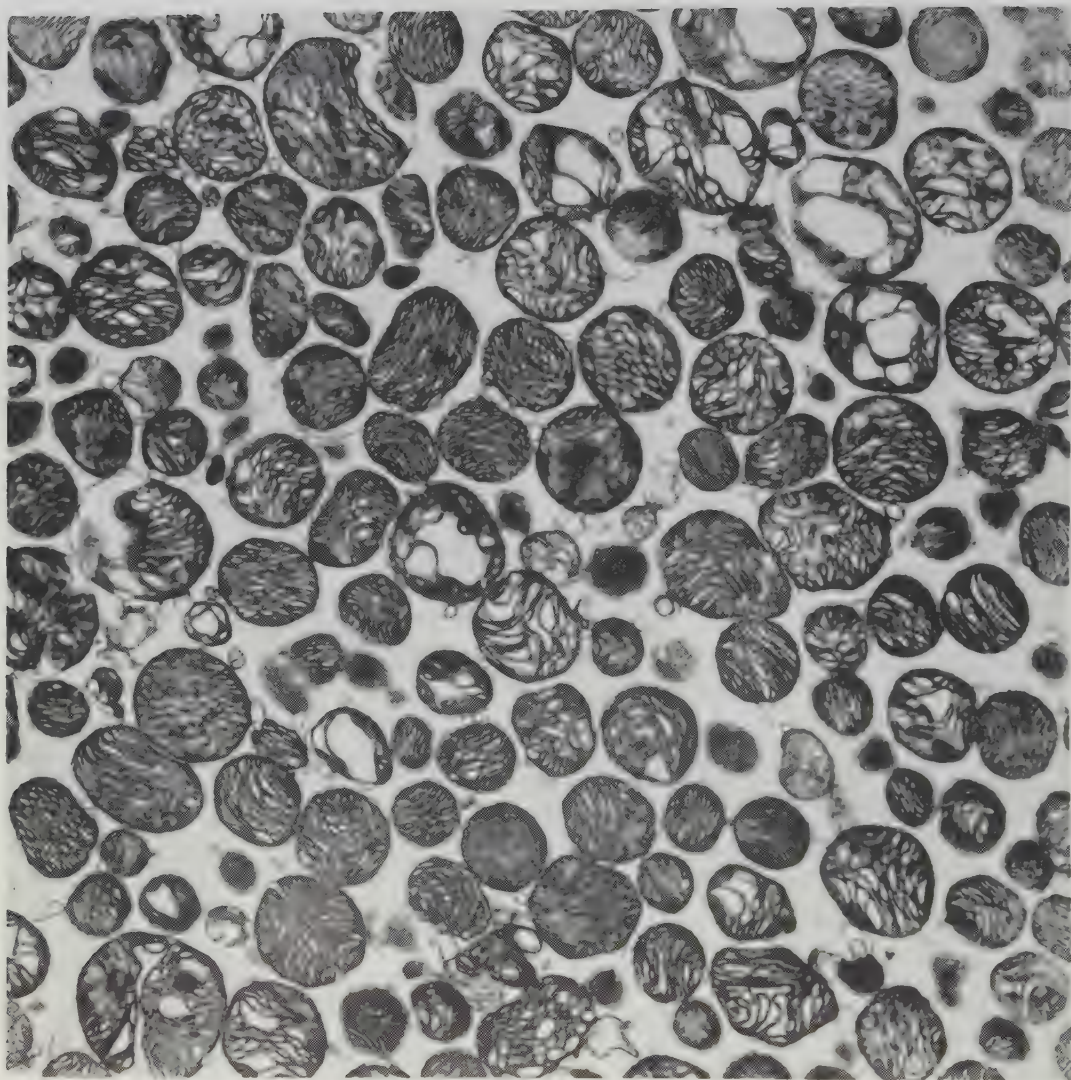


Fig. 4 : MITOCHONDRIES CARDIAQUES ISOLEES. La technique d'isolement et de fixation a été décrite dans (Matériel et Méthodes 4-1; 4-13). Grossissement (x 10400)

4 - MATERIEL ET METHODES

4-1 : ISOLEMENT DES MITOCHONDRIES DU COEUR DE RAT

Après excision les coeurs de rats φ (Sprague Dawley ou Wistar) ont été divisés en petits fragments dans un tampon (pH.7.4) contenant 0.25 M saccharose, $2.47 \cdot 10^{-3}$ M EDTA et 1.98. 10^{-2} M Tris, qui a été remplacé plusieurs fois jusqu'à ce que le liquide surnageant soit incolore. L'homogénéisation a été effectuée dans 2.5 volume (vol/poids) de tampon ci-dessus par 20 aller-retour dans un "potter" de 4/100 mm de "clearance" et tournant à 650 t/min. Cette opération a été suivie par trois centrifugations successives de 10' chacune à 269 g.max., 478 g.max. et 2990 g.max. La partie supérieure (1/3) du "pellet" a été éliminée, le reste est constitué de mitochondries à matrix dense prouvant la continuité de la membrane interne (Fig. 4).

4-2 : TECHNIQUE DE "SPIN-LABELING"

4-2a : Principe physico-chimique (Fig. 5)

Cette technique utilise les propriétés de résonance paramagnétique électronique (RPE) de radicaux très stables du type nitroxyde ($>NO\cdot$), qui peuvent être fixés sur de nombreux composés (lipides, sucres, acides aminés).

Les électrons appartenant au radical $>NO\cdot$ placés dans un champ magnétique externe ($H_{ext.}$) de direction Z, (Fig. 5), orientent leur moment magnétique de spin selon l'axe du champ magnétique. Conformément à la loi de répartition de Maxwell-Boltzman, à température ordinaire et à 9.5 GHz, 50.04% de la population d'électrons (e_2 ; Fig. 5) oriente leur moment magnétique de spin parallèlement au champ magnétique et acquiert une énergie linéairement décroissante $E = -\frac{1}{2} g\beta H$ (g : facteur g ; β : magnéton de Bohr; H : champ magnétique externe); 49.96% de la population d'électrons (e_1 ; Fig. 5) oriente leur moment magnétique de spin anti-parallèlement au champ externe et acquiert une énergie linéairement croissante $E = +\frac{1}{2} g\beta H$. La différence d'énergie entre les deux populations e_2 , e_1 est $\Delta E = g\beta H$. La condition de résonance est remplie si l'énergie $\Delta E = h\nu$ d'une onde électromagnétique envoyée dans le système correspond à la différence d'énergie $\Delta E = g\beta H$ entre les deux niveaux occupés respectivement par les populations d'électrons e_2 , e_1 . Dans ces conditions de résonance, des transitions $e_2 \rightleftharpoons e_1$ sont possibles. Une fraction de la population e_2 absorbe de l'énergie pour acquérir le niveau d'énergie e_1 et une fraction de la population e_1 libère de l'énergie pour atteindre le niveau d'énergie e_2 . Etant donné la différence de population $\Delta p = 0.08\%$ entre e_2 et e_1 ($e_2 > e_1$), il y a plus d'énergie absorbée par e_2 que d'énergie cédée au système par e_1 . L'onde électromagnétique à la sortie du système aura donc perdu une partie de son énergie incidente, cette perte pouvant se traduire sous forme d'une courbe d'absorption dans un système de détection (Fig. 5 partie gauche).

ESR: HYPERFINE COUPLING WITH ^{14}N NUCLEUS

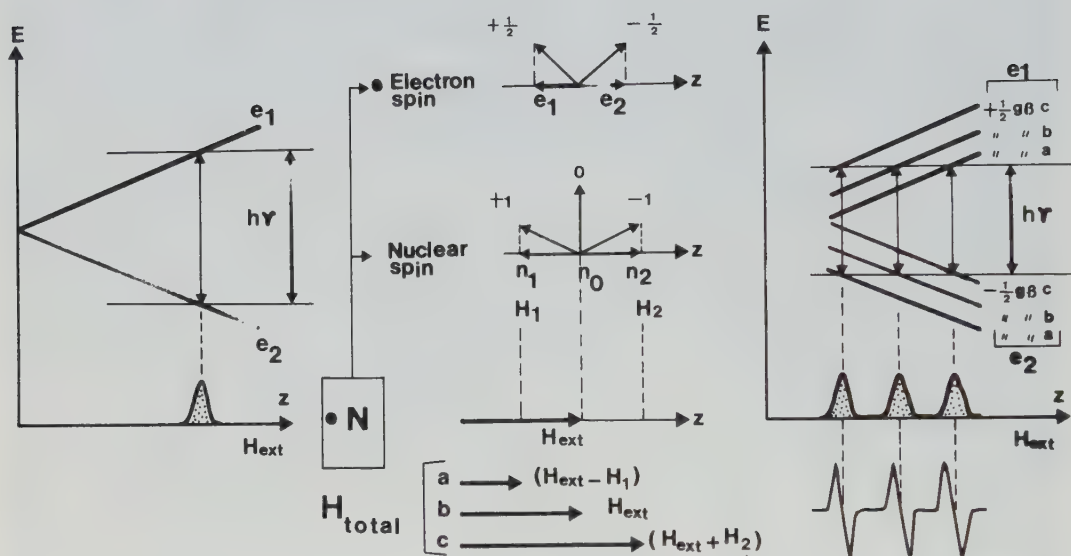


Fig. 5 : SIGNAUX DE RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE) OBTENUS AVEC DES DERIVES RADICALAIRES DU TYPE NITROXYDE ($>\text{NO}\cdot$) (cf. Matériel et Méthodes 4-2)

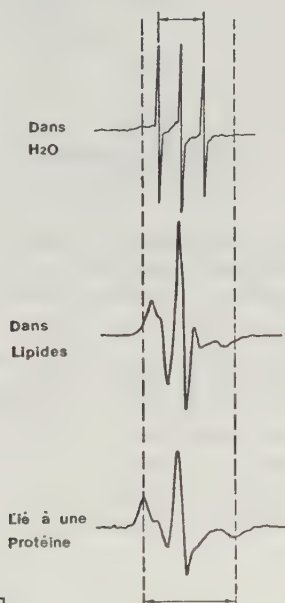
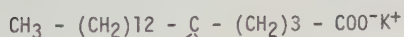
L'électron non apparié apparaissant dans le fragment $>NO\cdot$ appartient principalement à une orbitale 2 p de l'azote. ^{14}N (abondance naturelle 99.63%) a un spin $I_n = 1$; la projection du moment magnétique du spin nucléaire selon l'axe Z du champ magnétique peut prendre les trois valeurs $M_i = 1, M_i = 0, M_i = -1$ soient respectivement n_1, n_0, n_2 sur la Fig. 5. La population de spins électroniques e_1 peut ainsi occuper 3 niveaux d'énergie : $+\frac{1}{2} g\beta (H_{ext.} + H_2)$; $+\frac{1}{2} g.\beta. (H_{ext.})$; $+\frac{1}{2} g.\beta.(H_{ext.} - H_1)$; la population e_2 peut également occuper trois niveaux d'énergie : $-\frac{1}{2} g.\beta.(H_{ext.} + H_2)$; $-\frac{1}{2} g.\beta.H_{ext.}$; $-\frac{1}{2} g.\beta.(H_{ext.} - H_1)$. l'échange d'énergie entre les populations e_1, e_2 et l'onde électromagnétique injectée dans le système, peut avoir lieu pour 3 valeurs du champ magnétique externe, en accord avec la règle de sélection des transitions RPE impliquant $\Delta M_i = 0$. Etant donné que $e_2 > e_1$, trois pics d'absorption d'énergie de l'onde électromagnétique par le système de spins électroniques seront perçus par un système de détection.

Généralement les spectres d'absorption sont traduits sous forme de dérivée première. La hauteur des signaux est une fonction du nombre d'électrons non appariés.

Pour des raisons complexes, relevant de la mécanique quantique, la forme de ces trois signaux de RPE est extrêmement sensible au degré de mobilité de la molécule portant le radical ($>NO\cdot$); cette propriété a été mise à profit dans les recherches biologiques, puisque l'analyse des spectres peut nous donner des renseignements sur l'environnement de la "sonde" radicalaire (viscosité, ordre, distances).

4-2b : Quelques exemples de spectres (RPE) de l'acide stéarique "spin-labeled"

Soit de l'acide stéarique sous forme de savon potassique et porteur d'un radical nitroxyde :



COMPUTER - SIMULATED SPECTRA

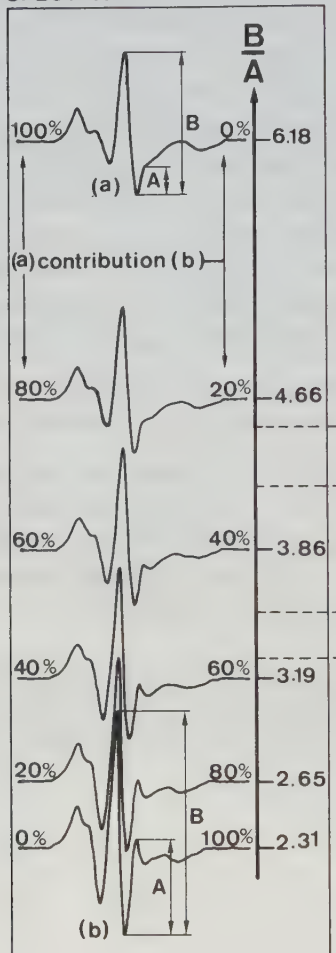


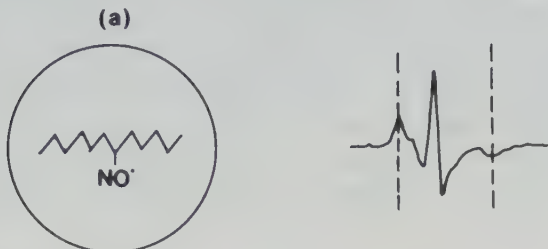
Fig. 6 : ANALYSE DE SPECTRES DE (RPE) DE TYPE MIXTE (ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" LIE AUX MEMBRANES MITOCHONDRIALES + LIE A L'ALBUMINE). Le principe général a été expliqué dans (Matériel et Méthodes 4-2c). La simulation a été obtenue à partir des deux spectres expérimentaux suivants :

(a) spectre pur de type albumine (Fig. 10a)

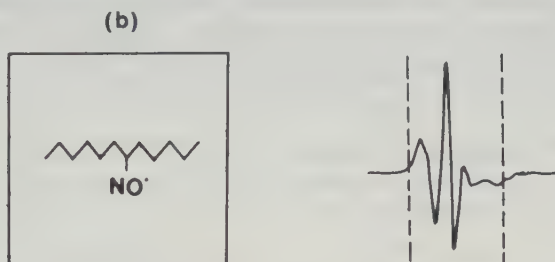
(b) spectre pur de type mitochondrial (Fig. 10b), dont les surfaces d'absorption (deuxième intégrale) ont été normalisées à la valeur arbitraire de 100 et dont les contributions respectives x et $(100 - x)$ ont été pondérées, avant de produire les différents signaux intermédiaires (dérivée première)

4-2c : Application à l'étude de la distribution d'un acide gras "spin-labeled", entre deux compartiments (a) et (b)

Un acide gras "spin-labeled", se trouvant dans un compartiment (a) peut donner un signal de RPE de type (a)



Le même acide gras, placé dans un compartiment (b) peut donner un spectre différent (b), si l'environnement (a) est différent de (b)



Si les deux compartiments peuvent échanger l'acide gras, un équilibre s'établira et le spectre résultant sera de type mixte (a + b) quant à la forme.

La contribution respective des deux compartiments à la production de ce spectre mixte, peut être déterminée selon la procédure qui suit :

1^o : Déterminer les coordonnées de chaque point des spectres (a) et (b), suivant un même système d'axe cartésiens x, y et obtenir par ordinateur la courbe d'absorption de chaque signaux (a) et (b), soit la deuxième intégrale des signaux dérivée première

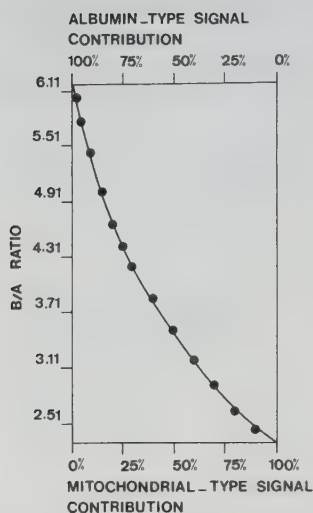


Fig. 7 : VARIATION DU RAPPORT (B/A) EN FONCTION DES CONTRIBUTIONS RESPECTIVES DES SIGNAUX DE TYPE ALBUMINE ET MITOCHONDRIAL. Les rapports arbitraires B/A ont été mesurés à partir des spectres simulés (Fig. 6) et la courbe a été ajustée par une régression polynomiale de degré 6.

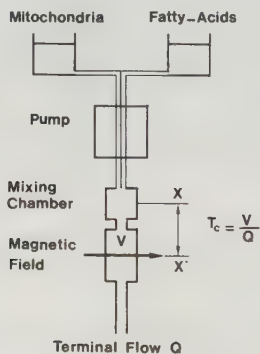


Fig. 8 : SCHEMA DE L'APPAREILLAGE POUR LA TECHNIQUE DE "MIXING-FLOW". La procédure expérimentale a été décrite dans (Matériel et Méthodes 4-3); V représente le volume compris entre X et X'; Tc le temps de contact des mitochondries et de l'acide stéarique "spin-labeled" entre X et X'; Q le débit terminal.

2° : Egaliser la quantité de spins (a) = (b) en égalisant les surfaces des courbes d'absorption.

3° : Obtenir par ordinateur les 2 signaux (a) et (b) normalisés (même nombre de spins) et simuler les spectres intermédiaires obtenus en mélangeant x% de (a) à (100 - x)% de (b).

Les spectres simulés, pour la distribution de l'acide stéarique "spin-labeled" entre le compartiment albumine (a) et le compartiment membranes mitochondriales (b) ont été représentés dans la Fig. 6; le rapport arbitraire B/A suit en fonction des contributions respectives (a) et (b), une courbe polynomiale du type $y = 4.06 x^6 - 1.08 x^5 + 1.17 x^4 - 6.69 x^3 + 2.09 x^2 - 3.47 x + 2.49$, représentée dans la Fig. 7, qui permet à partir d'un quelconque spectre expérimental mixte (type albumine + type mitochondrial) de déterminer le pourcentage de contribution des compartiments (a) et (b).

4-3 : TECHNIQUE DE "MIXING-FLOW". (Fig. 8)

La cinétique d'échange d'acide stéarique "spin-labeled" entre l'albumine et les membranes mitochondriales (5-1c-3; Fig. 12) a été analysée par la technique de "mixing-flow" : les mitochondries, dans le tampon contenant les cofacteurs (sans carnitine) décrit sous (4-6) ont été pré-incubées 1 h à 4°C, puis placées dans un compartiment à 37°C (Fig. 8); dans un deuxième compartiment a été placé, également à 37°C un même volume de tampon contenant $1.10^{-4}M$ d'acide stéarique "spin-labeled", sous forme de sel potassique, lié à $1.10^{-4}M$ d'albumine; les deux solutions ont été pompées à la même vitesse dans une chambre de mélange à 37°C; après un temps de contact (T_c) le mélange arrive dans la cellule de mesure de RPE. Le temps de contact (T_c) est variable en fonction du débit (Q) de la pompe. Si l'on définit par (V) le volume compris entre la cellule mélangeuse et la cellule de mesure, soit entre X et X', le temps de contact $T_c = V/Q$. Le volume (V) étant constant et connu, le débit (Q) pouvant se mesurer, le temps de contact (T_c) peut ainsi être calculé.

Les spectres de RPE ont été enregistrés à différent débit (Q) et correspondent à différents temps de contact (T_c). Pour chaque temps de contact (T_c), la distribution de l'acide gras entre le compartiment "albumine" et le compartiment "membranes mitochondriales" a été analysée selon la méthode décrite sous (4-2c). La courbe représentant la quantité d'acide gras "spin-labeled", contenue dans le compartiment "membranes mitochondriales" en fonction de (T_c), définit la cinétique d'entrée de l'acide gras dans les membranes mitochondriales (5-1c-3; Fig. 13).

4-4 : DEFINITION D'UN PARAMETRE EMPIRIQUE (h'/h) INDICATEUR DE LA MOBILITE DE LA MOLECULE D'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED".

Le temps de corrélation T_c est une mesure indicatrice de la vitesse de rotation d'une molécule sur elle-même. Freed et al (J. Chem. Phys. 39, 326, (1963)) et Stone et al (Proc. Natl. Acad. Sci. US. 54, 1010, (1965)), ont dérivé les équations mathématiques qui permettent de déterminer les valeurs de T_c en fonction des spectres de RPE.

$$T_c = \left[\left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} \right) - 2 \right] \left[4 \pi \sqrt{3} \cdot W_0 / b^2 \right]$$

Dans cette équation h_{+1} , h_0 , h_{-1} concernent la hauteur des pics respectivement à champ faible, intermédiaire et à champ fort; W_0 est la largeur de raie pic à pic du signal central et b est une constante d'interaction de l'électron radicalaire avec le noyau d'azote. Le domaine d'application de cette dérivation est extrêmement restreint puisqu'elle n'est valable que dans les limites suivantes $3 \cdot 10^{-10} < T_c < 5 \cdot 10^{-9} \text{ sec}^{-1}$; elle s'applique donc uniquement à des molécules en mouvement isotrope rapide.

Un paramètre empirique de mesure de la mobilité a été défini par Raison et Keith (The J. of Biol. Chem. Vol 246. p. 4036 (1971))

$$T_o = 6.5 \cdot 10^{-10} \cdot W_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right)$$

Lorsque le mouvement de la molécule est lent, le paramètre h_{-1} est très souvent impossible à mesurer.

Le temps de corrélation T_c et le paramètre empirique T_o , définis ci-dessus, sont proportionnels au rapport des hauteurs des pics RPE, c'est pourquoi nous pouvons justifier notre emploi d'un paramètre arbitraire, indicateur de la mobilité relative, en mesurant le rapport h'/h sur les pics de la Fig. 11 (5-1c-2).

4-5 : DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage des protéines a été effectué fondamentalement d'après la méthode de Lowry (19) suivant la séquence décrite ci-dessous.

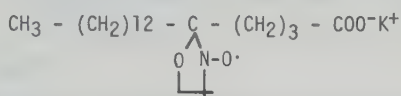
- 100 μ l de solution contenant les protéines + 100 μ l de NaOH 0.1M, 5' à 55°C
- ajouté à chaque tube, à la température de la chambre, 3 ml de réactif contenant les composés suivant : (Na_2CO_3 4%; CuSO_4 2%; tartrate K-Na 2%) mélangés dans les proportions respectives suivantes : 100/1/1.
- 10' plus tard, ajouter à chaque tube, 300 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu (Merck) dilué de $\frac{1}{2}$ avec H_2O
- 1 h plus tard, mesurer l'absorbance à 750 nm.

L'albumine sérique de boeuf (BSA) a été choisie comme protéine standard.

4-6 : MILIEU D'INCUBATION POUR L'ETUDE DE LA β -OXYDATION DES ACIDES GRAS, PAR LES MITOCHONDRIES CARDIAQUES.

Les concentrations optimales des différents composés de ce milieu ont été déterminées par Fritz et al (20,21). Soient :

- a) solution tampon : $7.9.10^{-3}M$ phosphate de sodium (pH.7.4) contenant $3.97.10^{-4}M$ EDTA, $6.7.10^{-2}M$ KCl et $0.1M$ saccharose
- b) solution de cofacteurs : $10^{-5}M$ L-malate, $10^{-3}M$ D, L-carnitine, $10^{-3}M$ ATP, $4.10^{-5}M$ CoA, $2.5.10^{-3}M$ NAD, $5.10^{-3}M$ $MgCl_2$, dans la solution tampon ci-dessus.
- c) solution de substrats : acide stéarique ($1-^{14}C$) ou "spin-labeled" en position C_5 ou C_{12} , sous forme de sel potassique, dans la solution tampon ci-dessus.



Ces substrats ont été liés, par simple mélange à $4^{\circ}C$, à l'albumine ou aux protéines du surnageant de coeur, selon les concentrations ou rapports molaires indiqués sous les figures.

Les mitochondries en suspension dans la solution tampon (a) ont été pré-incubées durant 1 h à $4^{\circ}C$, dans un même volume de solution de cofacteurs (b) pour éviter la réduction du radical $>N\cdot O$ par des processus différents de la β -oxydation, durant l'incubation subséquente à $37^{\circ}C$.

Lorsque la β -oxydation des acides gras devait être évitée, la D-L carnitine a été supprimée dans la solution de cofacteurs (b) ci-dessus.

4-7 : METHODES DE MESURE DE LA β -OXYDATION DE L'ACIDE STEARIQUE.

4-7a : Acide stéarique ($1-^{14}C$).

Après les incubations réalisées dans les conditions expérimentales indiquées sous les figures, l'échantillon total (mitochondries + milieu) a été saponifié durant 45' dans une solution contenant 90% d'éthanol et 10% de KOH; l'insaponifiable a été éliminé dans de l'éther de pétrole; après acidification, les acides gras ont été extraits dans de l'éther de pétrole. La quantité d'acide gras ayant subi la β -oxydation a été déterminée en soustrayant la valeur de la radio-activité (cpm) des échantillons témoins non-incubés, de celle des échantillons incubés à $37^{\circ}C$. La radio-activité a été déterminée dans un compteur à scintillation liquide.

4-7b : Acide stéarique "spin-labeled".

Les valeurs relatives des vitesses de β -oxydation ont été obtenues en mesurant dans une même série de spectres de forme identique, la variation de hauteur ($-dB/dt$) des signaux en fonction du temps; la hauteur B étant proportionnelle au nombre de spins radicalaires présents. La justification de cette méthode a été explicitée dans le paragraphe (5-1d-2).

4-8 : ISOLEMENT ET DELIPIDATION DU SURNAGEANT APRES HOMOGENEISATION DE COEUR DE RATS.

Les coeurs de 44 rates ϕ Wistar (300 gr), ont été rapidement excisés et fragmentés à 4°C dans 250 ml d'une solution 0.01M de phosphate de sodium (pH.7.4), contenant 0.25M sucrose et 3300 U/l de Liquémine comme anti-coagulant. La suspension a été ensuite soumise à une agitation magnétique et le tampon remplacé plusieurs fois jusqu'à ce que le liquide surnageant soit incolore. Les fragments de coeur, ont été resuspendus dans 1.5 vol/poids d'une solution contenant 0.01M phosphate de sodium (pH.7.4) et homogénéisés durant 2' dans un Omnimixer Sorvall (pos. 9). L'homogénat a été ensuite centrifugé durant 15' à 27.000 g.av. et le surnageant obtenu recentrifugé durant 1 h à 153.000 g.av. Ainsi débarrassé des fragments membranaires, le surnageant a été délipidé par extraction au butanol (20% vol/vol), selon le procédé A décrit dans la référence (22); la phase aqueuse a été lyophilisée ; il en est résulté une poudre dont le rendement a été de 1.85 gr.

4-9 : FILTRATION DE SURNAGEANT DE COEUR DE RATS, A TRAVERS DES GELS SEPHADEX G 75

500 mgr de poudre (préparée selon la méthode décrite sous 4-8) ont été suspendus dans 5 ml 0.005M phosphate de sodium (pH.7.4) par agitation durant 20' à 4°C après 10' de centrifugation à 27.000 g.av., le surnageant qui en est résulté a été déposé à la surface d'un gel de Séphadex G 75 préalablement dégazé et équilibré dans 0.005M phosphate de sodium (pH.7.4). La migration a été réalisée en flux descendant (21.1 ml/h) dans une colonne contenant un gel dont les dimensions étaient les suivantes (ϕ 3.7 cm; L 49 cm).

4-10 : ISOLEMENT DE LA PROTEINE (FABP) PAR CHROMATOGRAPHIE SUR CELLULOSE DE52.

Le contenu de 4 tubes (pic B, Fig. 22) renfermant le plus de protéines, a été transféré dans une cellule à ultrafiltration du type Amicon 12, munie d'une membrane diaflo UM10, afin de concentrer les protéines et de les transférer dans un tampon 0.01M Tris-acide phosphorique (pH.8.3); 1.2 - 1.4 ml de ces protéines (6-8 mgr/ml) a été agité à 4°C durant 20' dans 2 ml de tampon 0.01 M Tris-acide phosphorique (pH.8.3) contenant environ 1 gr de cellulose DE52 humide, préalablement dégazée et équilibrée dans ce même tampon. La suspension a été ensuite déposée dans une colonne, à la surface d'un gel de cellulose DE52 (15 mm x 150 mm) préalablement dégazée et équilibrée comme précédemment. Les protéines, non fixées sur la cellulose DE52 ont été éluées avec 120 ml 0.01M Tris-acide phosphorique (pH.8.3) (Fig. 26 a). La protéine se liant aux acides gras (FABP) a été éluée (Fig. 26 b II), par le passage d'un gradient linéaire de KCl obtenu en mélangeant 40 ml 0.01M Tris-acide phosphorique (pH.6.3) avec 40 ml de ce même tampon contenant 0.2M KCl; le débit a été maintenu à 32.6 ml/h.

4-11 : ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.

Les gels Tris-HCl (Fig. 24 a) contenant 9% d'acrylamide ont été préparés selon Davis (23); la migration s'est effectuée à une intensité de 2.5 mA/gel en présence d'un tampon obtenu en ajoutant 11.5 gr de glycine dans 1 l H₂O contenant 2.4 gr de Tris.

Les gels SDS (Fig. 24 b) contenant 15% d'acrylamide ont été préparés et traités selon Weber et coll. (24); la migration s'est effectuée en maintenant une intensité constante de 8 mA/gel.

Tous les gels ont été colorés pendant 45' à 60°C dans une solution aqueuse contenant 0.22% de Coomassie Brilliant Blue, 45% de méthanol et 9% d'acide acétique. La décoloration a été réalisée par électrophorèse transverse dans de l'acide acétique 7%.

4-12 : "ISOELECTRIC FOCUSING"

Les déterminations de pI ont été réalisées sur des plaques d'Ampholine LKB de dimensions: 245 x 110 x 1 mm contenant 5% d'acrylamide et 2.4% (poids/volume) d'ampholine, créant un gradient de pH compris entre 3.5 - 9.5. Après 5 h de migration à une puissance de 10 W, une intensité de 2 mA et sous une tension de 150 - 170 V, les pH ont été déterminés avec une micro-électrode de contact connectée à pHmètre du type PHM 63 Digital; la coloration des gels a été réalisée selon Malik et coll. (25).

4-13 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Après 1 h de fixation dans un tampon contenant 0.1M phosphate de sodium (pH.7.4), suivie par une post-fixation de 1 h dans 2% O₅O₄, le culot mitochondrial a été déshydraté à l'alcool et enrobé dans de l'Epon (26). Les sections fines ont été examinées au microscope électronique Philips EM 300.

4-14 : LIPOSOMES

Les lipides totaux extraits des mitochondries ont été mélangés (rapport molaire moyen ~ 500/1) dans du chloroforme méthanol 2:1 (v/v) à de l'acide stéarique "spin-labeled" en position C₅, puis séchés sous un courant d'azote. Après 20" de sonication (Branson Sonifier B-12, micro-tip Ø 1/8"; 1 5 1/2", 55 W, 20 kHz) à 37°C, la suspension a été centrifugée durant 15' à 500 g.av. . L'observation au microscope électronique, après coloration négative (1% phosphotungstate de sodium dans H₂O), a révélé dans le surnageant la présence de liposomes de type multilamellaire.

4-15 : ORIGINE DES REACTIFS

L'albumine de boeuf (BSA) dégraissée et la D-L carnitine ont été obtenues chez : Sigma, Chemical Company (Saint-Louis, Missouri, USA); l'acide stéarique "spin-labeled" chez Synvar (Palo-Alto, California, USA); l'acide stéarique ($1-^{14}\text{C}$) au Radiochemical Centre (Amersham, England) et le CoA, ATP, NAD^+ de Boehringer (Mannheim, Germany); le Séphadex G 75 de Pharmacia (Uppsala, Sweden); la Cellulose DE52 de Whatman (Maidstone, Kent, England); les plaques d'Ampholine pour "isoelectric focusing" de LKB (Stockholm, Sweden) et la Liquémine de Hoffmann-La Roche (Bâle, Suisse).

5 - RESULTS

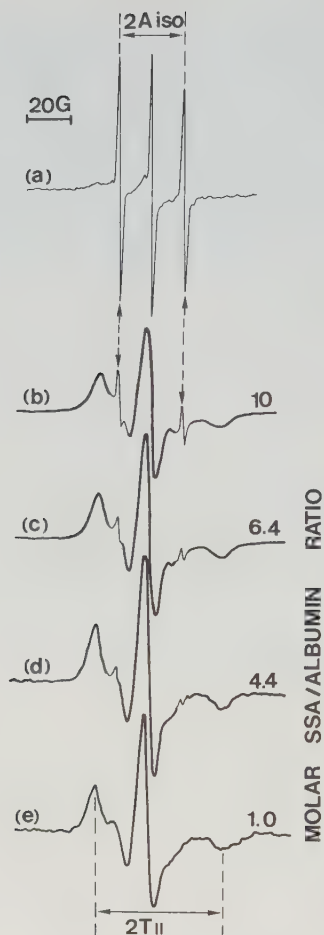


Fig. 9 : FORMATION DU SIGNAL DE (RPE) (TYPE ALBUMINE)

(a) signal obtenu avec l'acide stéarique "spin-labeled" (SSA), ($0.5 \cdot 10^{-4} \text{M}$, sous forme de sel potassique dans le tampon décrit dans : Matériel et Méthodes 4-6a).

(b-c-d-e) signaux résultant du mélange dans le même milieu que ci-dessus de $0.5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ d'albumine avec respectivement $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $3.2 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $2.2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ et $0.5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ d'acide stéarique "spin-labeled" sous forme de sel potassique.

5 - RESULTATS

5-1 : REGULATION, IN VITRO, DU SYSTEME β -OXYDATIF MITOCHONDRIAL PAR L'ALBUMINE, UTILISEE EN TANT QUE MODELE DE TRANSPORTEUR D'ACIDES GRAS.

5-1a : INTRODUCTION

A cause de leur insolubilité en phase aqueuse, les acides gras à longue chaîne, utilisent des transporteurs amphiphiles pour leur translocation dans des milieux biologiques. L'albumine est le véhicule des acides gras dans le système circulatoire.

Les véhicules transportant les acides gras à travers le cytoplasme n'ayant été que très récemment isolés (8,9), toutes les études, in vitro, sur des processus enzymatiques impliquant des acides gras et en relation avec des organelles intra-cellulaires (microsomes, mitochondries) ont utilisé l'albumine comme "translocateur"; dans ces cas, cette protéine ne doit être considérée que comme un modèle de transporteur car elle n'a physiologiquement, in vivo, jamais accès au compartiment intra-cellulaire.

De nombreux auteurs (12-18) ont signalé l'influence du rapport molaire ($\bar{v}$ = acide gras / albumine) sur la vitesse de la β -oxydation des acides gras par les mitochondries, sans pouvoir toutefois en expliquer le mécanisme.

Dans le chapitre qui va suivre, l'albumine sera également utilisée comme modèle de transporteur d'acides gras alimentant en substrat, in vitro, le système β -oxydatif mitochondrial. L'emploi, pour la première fois, d'un acide gras "spin-labeled" dans l'étude du système β -oxydatif nous permettra de comprendre comment l'albumine, par l'intermédiaire des membranes mitochondriales peut contrôler très efficacement la vitesse de β -oxydation des acides gras.

5-1b : LIAISON DE L'ACIDE STEARIQUE A L'ALBUMINE, VISUALISEE PAR "SPIN-LABELING".

Dans un milieu hydrophile, l'acide stéarique "spin-labeled", sous forme de savon potassique, donne un signal de RPE qui est composé de trois pics caractérisés par une valeur de "splitting" hyperfin A_{iso} égale à 15.7 ± 0.4 G (Fig. 9a).

En présence d'albumine, un second type de signal dans lequel $2T_{//} = 64 \pm 0.4$ G, se superpose au précédent signal (Fig. 9b-d).

La contribution relative de ces deux types de signaux, dépend de $\bar{v}$ = rapport molaire acide stéarique/albumine. Lorsque ce rapport est égal à 1, seul le signal dû à l'acide gras lié à l'albumine subsiste (Fig. 9e); dans ce cas, la valeur élevée de $2T_{//} = 64 \pm 0.4$ G est caractéristique d'une mobilité restreinte de la molécule d'acide gras dont la liaison possible à l'albumine est bien connue (27-29); pour ce rapport de $\bar{v} = 1$, l'absence totale de signal isotrope, indique que toutes les molécules d'acide gras sont fixées à l'albumine.

-1c : ECHANGE D'ACIDES STEARIQUE "SPIN-LABELED" ENTRE L'ALBUMINE ET LES MEMBRANES MITOCHON-
DRIALES.

-1c-1 : Caractérisation du signal de RPE dû à l'acide stéarique "spin-labeled" lié aux membra-
nes mitochondriales.

L'acide stéarique "spin-labeled" totalement lié à l'albumine ($\bar{\nu} = 1$) (Fig. 10a), peut être cédé aux mitochondries ainsi que nous indique le spectre (Fig. 10b) obtenu après incubation à 37°C des mitochondries avec l'albumine, suivie de trois lavages successifs pour éliminer l'albumine.

Ce signal, dont la valeur de $2T_{//} = 46.5 \pm 0.4$ G, provient du transfert de l'acide gras de l'albumine vers les mitochondries selon un processus non-enzymatique puisqu'il peut être obtenu après dénaturation des enzymes mitochondriaux à 70°C (Fig. 10c).

-1c-2 : Environnement de l'acide stéarique "spin-labeled", dans les membranes mitochondriales.

Le paramètre relatif de mobilité h'/h , défini dans (Matériel et Méthodes 4-4) évalue le degré de restriction imposé au mouvement de l'acide gras par son environnement; ce dernier peut être modifié par traitement au glutaraldéhyde lorsqu'il s'agit de protéines ou par l'osmium (O_5O_4) si l'environnement est lipidique.

Après introduction d'acide stéarique "spin-labeled" dans les membranes mitochondriales, le paramètre h'/h a été mesuré pour les conditions suivantes :

		h'/h
Mitochondries témoins	(Fig. 11a)	0.81
Mitochondries post-fixées à l'osmium	(Fig. 11b)	0.39
Mitochondries post-fixées au glutaraldéhyde	(Fig. 11c)	0.96

L'index de mobilité h'/h a également été déterminé dans des membranes artificielles lipidiques obtenues après sonication en phase aqueuse de lipides extraits des mitochondries (Matériel et Méthodes 4-14).

Liposomes	(Fig. 11d)	0.98
-----------	------------	------

Le changement le plus abrupt a été obtenu en polymérisant la phase lipidique des membranes mitochondriales avec l'osmium. Ceci indique que l'acide gras dans les membranes mitochondriales est dans un environnement essentiellement lipidique.

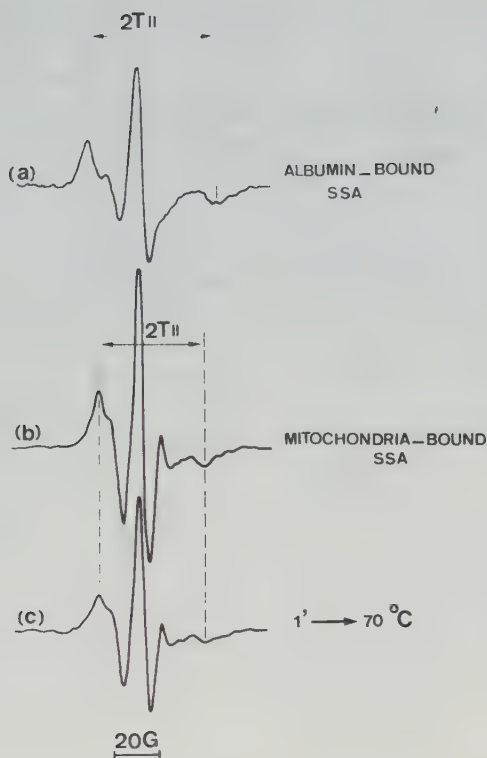


Fig. 10 : FORMATION DU SIGNAL DE (RPE) (TYPE MITOCHONDRIAL)

(a) signal du type albumine obtenu à 37°C après 5' d'incubation de $0.5 \cdot 10^{-4}M$ d'albumine avec $0.5 \cdot 10^{-4}M$ d'acide stéarique "spin-labeled" (SSA) sous forme de sel potassique;

(b) 3 ml d'une suspension de mitochondries (12 mgr/ml) ont été pré-incubées à 4°C pendant 1 h dans 3 ml de tampon contenant les cofacteurs, mais en absence de carnitine (Matériel et Méthodes 4-6a); 6ml de solution tampon contenant $1 \cdot 10^{-4}M$ d'albumine et $1 \cdot 10^{-4}M$ d'acide stéarique "spin-labeled" (SSA) sous forme de sel potassique ont été ajoutés au milieu qui ensuite a été incubé 5' à 37°C. Les mitochondries, lavées trois fois par centrifugation à 4000 g.av. ont été resuspendues dans la solution tampon (4 mgr/ml). Les signaux de RPE ont été obtenus à 37°C;

(c) même procédure que sous (b) mais au préalable la suspension de mitochondries a été incubée 1' à 70°C.

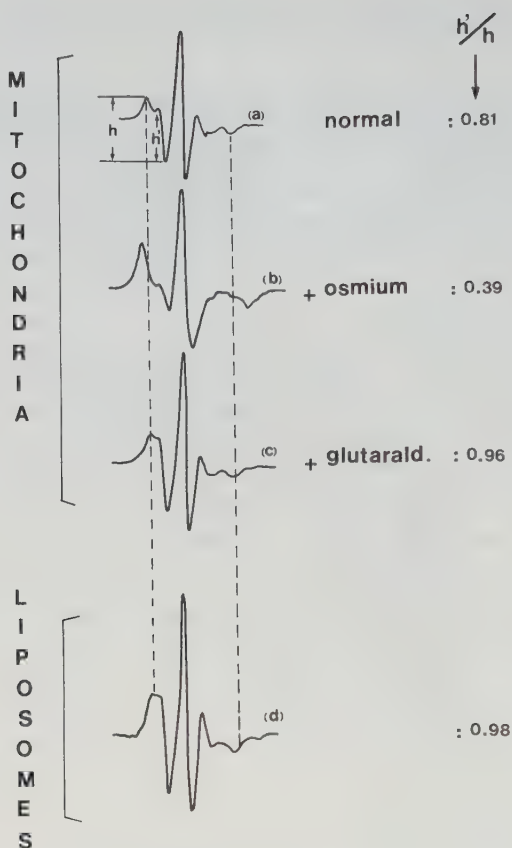


Fig. 11 : MODIFICATIONS DU SIGNAL DE (RPE) DU TYPE MITOCHONDRIAL, INDUITES PAR POST-FIXATION A L'OSMIUM (O_5O_4) OU AU GLUTARALDEHYDE.

(a) signal de type mitochondrial obtenu selon la procédure décrite sous (Fig. 10b);

(b) signal de type mitochondrial obtenu selon la procédure décrite sous (Fig. 10b) excepté que dans la dernière étape, les mitochondries ont été resuspendues dans la solution tampon contenant 2% d'osmium (O_5O_4);

(c) signal de type mitochondrial obtenu selon la procédure décrite sous (fig. 10b) excepté que dans la dernière étape les mitochondries ont été resuspendues dans la solution tampon contenant 4% de glutaraldehyde;

(d) signal de l'acide stéarique "spin-labeled" incorporé dans des liposomes (Matériel et Méthodes 4-14);

Le rapport h'/h est un index relatif de mobilité de la molécule d'acide gras, défini dans (Matériel et Méthodes 4-4).

5-1c-3 : Cinétique du transfert de l'acide stéarique "spin-labeled" de l'albumine vers les membranes mitochondriales.

La cinétique du transfert de l'acide gras de l'albumine vers les membranes mitochondriales a été expérimentée suivant la technique de "mixing-flow" décrite dans (Matériel et Méthodes 4-3) et l'analyse des spectres de RPE selon la procédure de simulation à l'ordinateur présentée dans (Matériel et Méthodes 4-2c).

Les signaux expérimentaux obtenus (Fig. 12) résultent de la contribution additive du signal albumine et du signal membranes mitochondriales dans des proportions variables en fonction du temps de contact (T_c) des mitochondries avec le complexe albumine-acide gras. La cinétique à double palier obtenue (Fig. 13) suggère la saturation successive de deux compartiments; le premier est saturé après 1'30" et le deuxième après 5'.

5-1c-4 : Réversibilité et partition de l'acide stéarique "spin-labeled" entre l'albumine et les membranes mitochondriales.

Les mitochondries ont été incubées durant 5' à 37°C dans un milieu contenant de l'acide stéarique "spin-labeled" lié à l'albumine (rapport molaire $\bar{v} = 1$), puis lavées par trois centrifugations successives pour éliminer l'albumine et obtenir un signal mitochondrial pur (Fig. 14a); la partition définie par le rapport $P = \text{contribution du signal mitochondrial en \%} / \text{contribution du signal albumine en \%}$, est égale à 67.4; l'addition de $0.5 \cdot 10^{-4}M$, $1 \cdot 10^{-4}M$ et $2 \cdot 10^{-4}M$ d'albumine au milieu, redistribue l'acide gras entre les mitochondries et l'albumine (Fig. 14b,c,d) selon des valeurs de partition P respectivement égales à 2.61, 2.12 et 1.12.

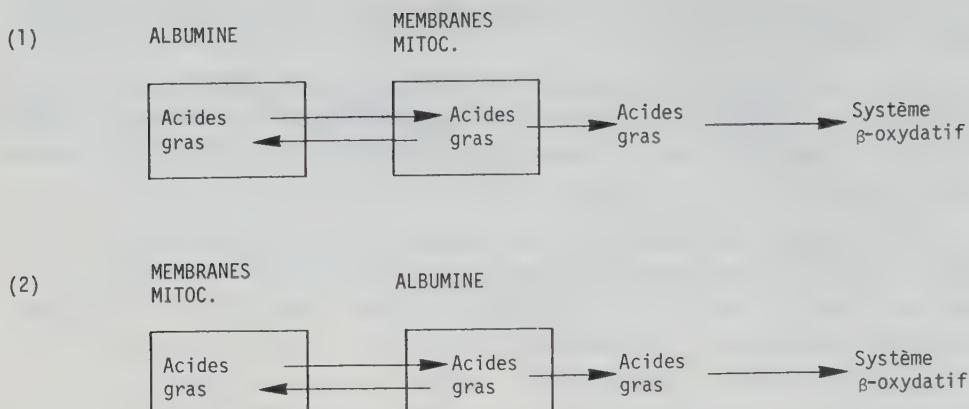
Le transfert d'acides gras, de l'albumine vers les membranes mitochondriales est donc réversible; l'équilibre est obtenu après partition de l'acide gras en fonction de la concentration en albumine.

5-1d : CONTROLE DU SYSTEME β -OXYDATIF PAR L'ALBUMINE, DANS LES MITOCHONDRIES CARDIAQUES ISO-LEES.

5-1d-1 : Introduction

Le système β -oxydatif des mitochondries cardiaques est constitué schématiquement de la série d'étapes biochimiques et physico-chimiques suivantes : Acides gras $\rightleftharpoons$ Acyl-CoA $\rightarrow$ Acylcarnitine $\rightarrow$ Electrophorèse à travers la membrane interne $\rightarrow$ Acylcarnitine $\rightarrow$ Acyl-CoA $\rightarrow$ β -oxydation $\rightarrow$ Acetyl-CoA; ces étapes ont été exposées dans la (Fig. 3).

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que les acides gras se distribuaient entre l'albumine et les membranes mitochondriales. L'étude qui va suivre a comme but d'une part de déterminer lequel de ces deux réservoirs (albumine ou membranes mitochondriales) alimente le système β -oxydatif en substrat (acides gras), d'autre part de préciser laquelle des deux séquences ci-dessous est opérationnelle.



Dans la séquence (1) l'albumine en tant que transporteur d'acides gras, ne réagit pas avec le système enzymatique et ne participe qu'à un échange physico-chimique d'acides gras avec les membranes mitochondriales.

Dans la séquence (2), les membranes mitochondriales sont des réservoirs d'acides gras, dont le transfert au système enzymatique nécessiterait un transporteur, par exemple l'albumine.

5-1d-2 : Justification de l'emploi d'acides gras "spin-labeled" dans l'étude de la β -oxydation; mesure de leur vitesse de β -oxydation.

Des dérivés, légèrement modifiés par rapport aux acides gras naturels, mais se comportant de façon identique du point de vue biochimique, tout en possédant l'avantage d'être plus aisés à détecter ou à quantifier, ont été fréquemment utilisés dans les études métaboliques sur les acides gras. Knoop en 1904 (30) grâce à des dérivés W-phénylés a découvert la β -oxydation. Par la suite, des acides gras marqués isotopiquement avec du carbone C^{13} (31) ou C^{14} ont été fréquemment employés.

Malgré que Keith et al (32) aient démontré chez *Neurospora crassa*, le comportement similaire des acides gras "spin-labeled" et des acides gras naturels; les acides gras "spin-labeled" n'ont jamais été utilisés comme substrat dans des études enzymatiques, probablement à cause de la difficulté à stabiliser leurs signaux de RPE dans les systèmes biologiques qui généralement réduisent spontanément le radical $>NO\cdot$.

Nous avons observé dans la présente étude, que deux conditions devaient être respectées pour stabiliser les signaux de RPE.

1° : ne travailler qu'avec des mitochondries structurellement intactes, sans discontinuité de la membrane interne, présentant donc une matrix dense en microscopie électronique (Fig. 4)

2° : pré-incuber les mitochondries 1 h à 40°C dans la solution de cofacteurs (Matériel et Méthodes 4-6)

Dans ces conditions, durant l'incubation subséquente à 37°C, dans le milieu requis pour la β -oxydation (Matériel et Méthodes 4-6), la disparition du signal de RPE, au cours du temps, n'est due qu'à la β -oxydation de l'acide gras "spin-labeled", car dans les mêmes conditions, mais en l'absence de carnitine, les signaux restent totalement stables (Fig. 15a). Dans des conditions de β -oxydation possible (présence de carnitine), la hauteur B des signaux de RPE diminue linéairement au cours du temps sans que la forme des signaux ne change (Fig. 15b); par conséquent la vitesse de cette cinétique peut être mesurée par la pente constante $-dB/dt$; la cinétique de disparition de l'acide gras "spin-labeled" étant identique à celle de l'acide stéarique ($1-C^{14}$) (Fig. 15), les vitesses de β -oxydation de ces deux types d'acides gras, sont égales :

$$-dB/dt = \frac{-d[\text{acide stéarique } 1-C^{14}]}{dt}$$

5-1d-3 : Cinétique de β -oxydation de l'acide stéarique "spin-labeled", préalablement lié à l'albumine.

Une quantité fixe d'acide stéarique "spin-labeled", soit $0.5 \cdot 10^{-4}M$, a été liée à respectivement : $0.1 \cdot 10^{-4}M$; $0.25 \cdot 10^{-4}M$; $0.5 \cdot 10^{-4}M$; $1.0 \cdot 10^{-4}M$; $2 \cdot 10^{-4}M$ et $4 \cdot 10^{-4}M$ d'albumine, donnant respectivement les rapports molaires $\bar{v} = (\text{acides gras/albumine})$ suivant : 5; 2; 1; 0.5; 0.25; 0.125.

En présence de mitochondries, à 37°C, dans un milieu d'incubation contenant les cofacteurs requis pour la β -oxydation (Matériel et Méthodes 4-6), l'acide gras est catabolisé à des vitesses ($-dB/dt$) différentes; elles varient dans le même sens que $\bar{v}$, c'est à dire qu'elles sont diminuées par des concentrations croissantes d'albumine (Fig. 16 et tableau page suivante).

X	Y	X/Y	
acide stéarique "spin-labeled"	albumine	$\bar{v}$	Vitesse relative de β -oxydation -dB/dt
0.5 . 10 ⁻⁴ M	0.1 . 10 ⁻⁴ M	5	8.12 $\pm$ 0.08
0.5 . 10 ⁻⁴ M	0.25 . 10 ⁻⁴ M	2	6.86 $\pm$ 0.11
0.5 . 10 ⁻⁴ M	0.50 . 10 ⁻⁴ M	1	7.04 $\pm$ 0.04
0.5 . 10 ⁻⁴ M	1.0 . 10 ⁻⁴ M	0.50	4.91 $\pm$ 0.07
0.5 . 10 ⁻⁴ M	2.0 . 10 ⁻⁴ M	0.25	3.54 $\pm$ 0.13
0.5 . 10 ⁻⁴ M	4.0 . 10 ⁻⁴ M	0.125	3.23 $\pm$ 0.02

Même si initialement l'acide gras est localisé exclusivement sur l'albumine, au cours de la cinétique de β -oxydation, il se distribue entre l'albumine et les membranes mitochondriales selon un rapport défini par :

$$p = \frac{\text{contribution du signal mitochondrial en \%}}{\text{contribution du signal albumine en \%}}$$

qui reste constant pour une concentration donnée d'albumine (Fig. 17). Les vitesses de β -oxydation varient dans le même sens que P, c'est à dire qu'elles dépendent de la contribution du signal : "membranes mitochondriales" (Fig. 18 et tableau ci-dessous)

	Y	X	X/Y	
Albumine	Contribution signal Albumine en %	Contribution signal mitochondrial en %	Distribution P	Vitesse relative de β -oxydation
0.1 . 10 ⁻⁴ M	5.4	94.6 $\pm$ 2.2	19.77	100
0.25 . 10 ⁻⁴ M	18.15	81.85 $\pm$ 5.0	4.79	84.4
0.50 . 10 ⁻⁴ M	27	73 $\pm$ 2.1	2.71	86.7
1.0 . 10 ⁻⁴ M	32	68 $\pm$ 3.2	2.15	60.5
2.0 . 10 ⁻⁴ M	50.9	49.1 $\pm$ 3.4	0.97	43.6
4.0 . 10 ⁻⁴ M	64.6	35.4 $\pm$ 2.8	0.55	39.9

COMPUTER - SIMULATED SPECTRA

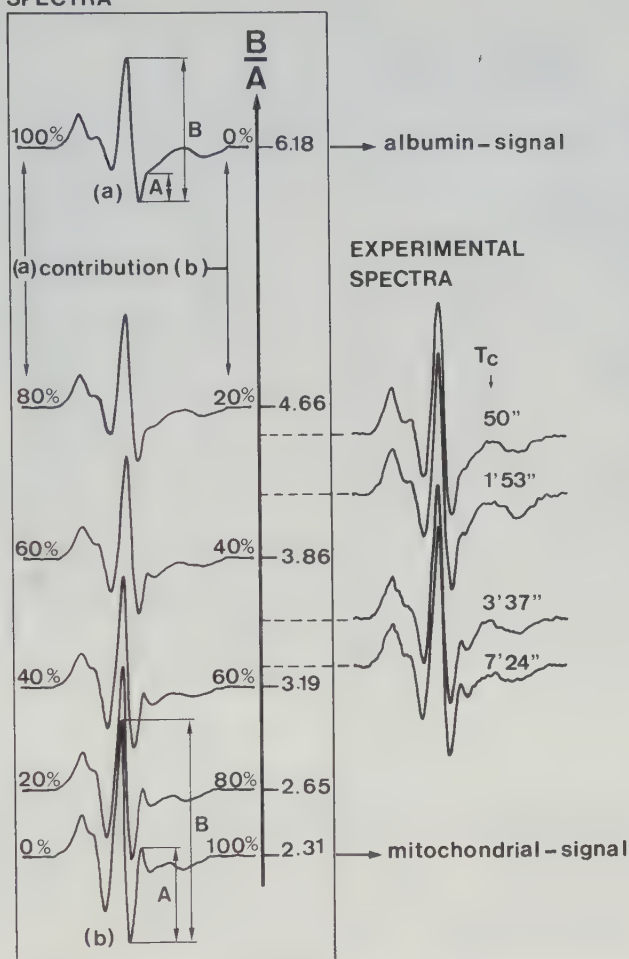


Fig. 12 : CINETIQUE D'ENTREE DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" DANS LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES : SIGNAUX EXPERIMENTAUX. Les mitochondries (5.76 mgr/ml) dans le tampon contenant les cofacteurs, mais en absence de carnitine (Matériel et Méthodes 4-6) ont été pré-incubées 1 h à 4°C; le "mixing-flow" a été réalisé à 37°C par mélange des mitochondries ci-dessus avec $1.10^{-4}M$ d'acide stéarique "spin-labeled" (SSA) lié à $1.10^{-4}M$ d'albumine selon la technique décrite dans (Matériel et Méthodes 4-3); T_c concerne le temps de contact des mitochondries avec l'acide gras.

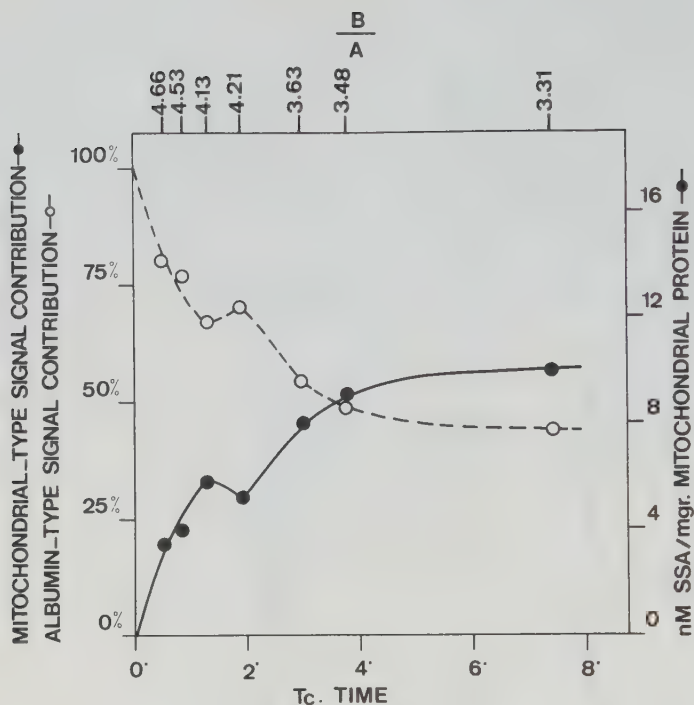


Fig. 13 : CINETIQUE D'ENTREE DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" (SSA) DANS LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES. Les signaux expérimentaux ont été obtenus suivant la procédure décrite sous Fig. 12. Les contributions respectives des signaux de type albumine et mitochondrial ont été calculées selon la méthode décrite dans (Matériel et Méthodes 4-2c); T_c désigne le temps de contact des mitochondries avec l'acide gras.

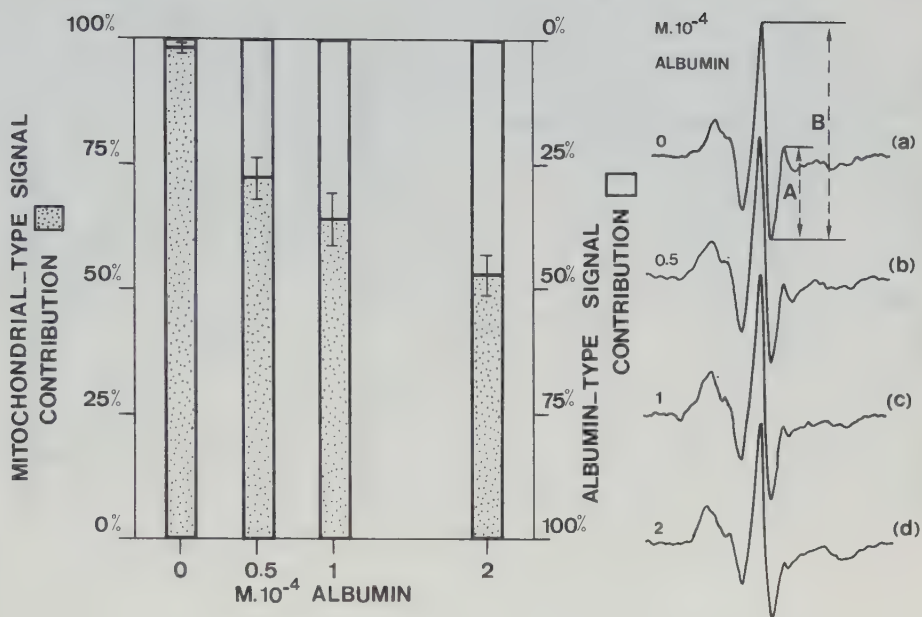


Fig. 14 : REDISTRIBUTION DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" (SSA) ENTRE L'ALBUMINE ET LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES. Le signal de type mitochondrial pur (a) a été obtenu suivant les conditions décrites sous Fig. 10b. Les autres spectres (b,c,d) ont été obtenus à 37°C après addition de respectivement $0.5 \cdot 10^{-4}M$, $1 \cdot 10^{-4}M$ et $2 \cdot 10^{-4}M$ d'albumine. Les contributions respectives des signaux de type albumine et mitochondrial ont été calculées selon la procédure décrite dans (Matériel et Méthodes 4-2c).

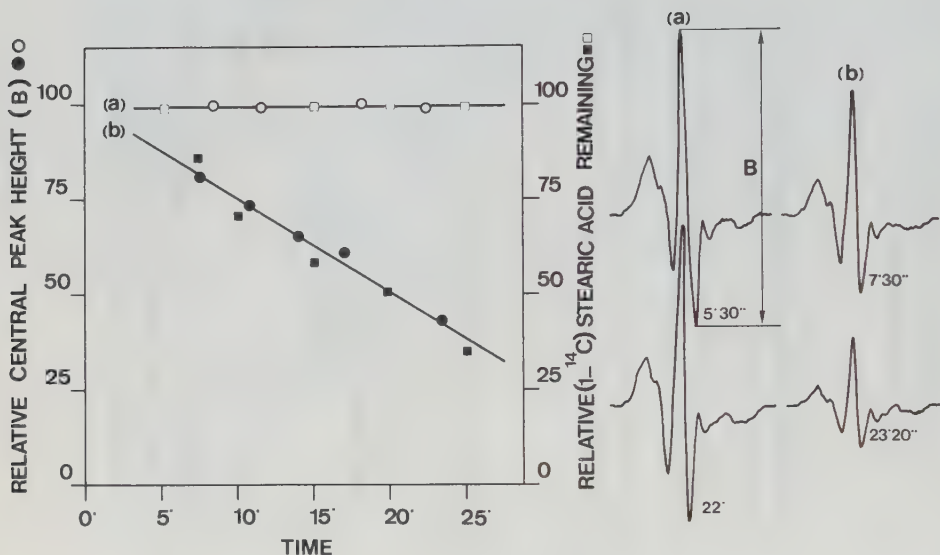


Fig. 15 : VITESSE DE β -OXYDATION COMPAREE DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" (SSA) ET DE L'ACIDE STEARIQUE ($1-^{14}\text{C}$). Les mitochondries (4.06 mgr/ml) en suspension dans le tampon contenant les cofacteurs (Matériel et Méthodes 4-6) ont été pré-incubées 1 h à 4°C . L'acide stéarique "spin-labeled" (SSA) ou l'acide stéarique ($1-^{14}\text{C}$) sous forme de sel potassique lié à l'albumine (rapport molaire : acide gras/albumine = 1) a été ajoutée ensuite à la suspension de mitochondries, de telle sorte que la concentration finale en acide stéarique soit de $0.5 \cdot 10^{-4}\text{M}$. La β -oxydation de l'acide stéarique normale, après incubation à 37°C a été analysée après extraction des acides gras (Matériel et Méthodes 4-7a) et celle de l'acide stéarique "spin-labeled" (SSA) en mesurant la diminution de hauteur (B) du pic central des signaux de RPE (Matériel et Méthodes 4-7b).

(a) sans carnitine. (b) avec carnitine

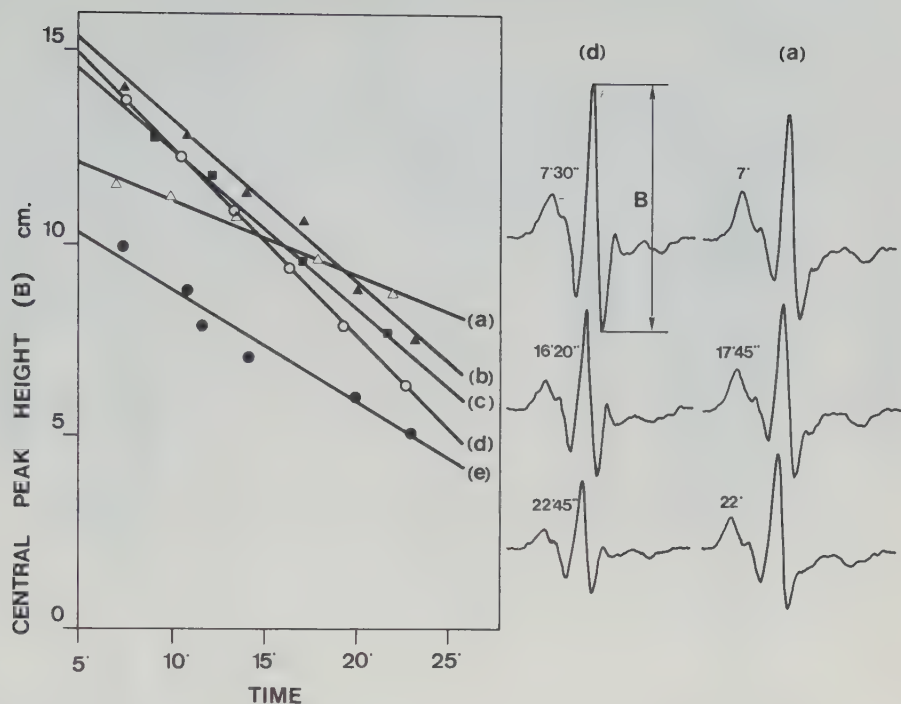


Fig. 16 : EFFET DE L'ALBUMINE SUR LA CINETIQUE DE β -OXYDATION DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED". La procédure expérimentale est la même que celle décrite sous la Fig. 15, excepté que l'acide gras ($0.5 \cdot 10^{-4}M$) a été lié à l'albumine dans le rapport molaire (acide gras/albumine) suivant : (a) 0.125; (b) 1; (c) 2; (d) 5; (e) 0.5. Les incubations ont été effectuées à $37^{\circ}C$.

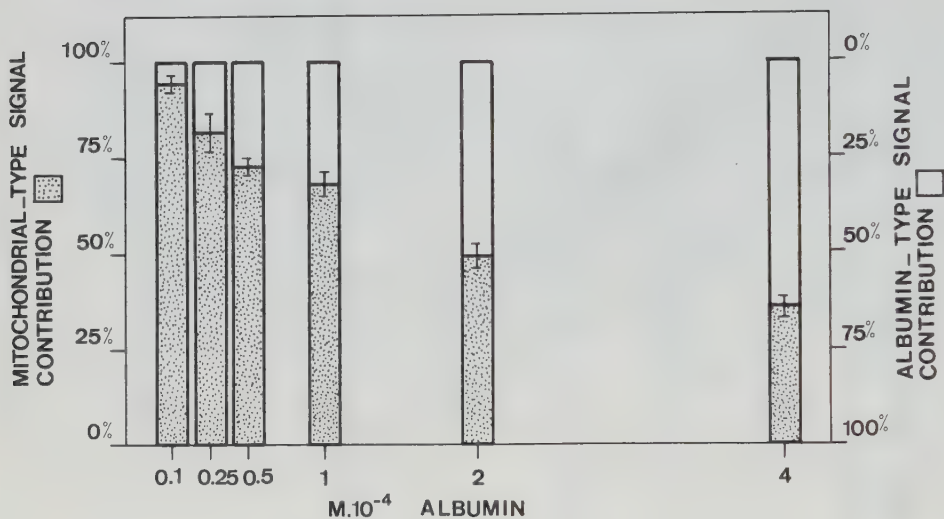


Fig. 17 : DISTRIBUTION DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" ENTRE LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES ET L'ALBUMINE AU COURS DE LA CINETIQUE DE β -OXYDATION. La procédure expérimentale a été décrite sous la Fig. 16. Les contributions des signaux du type albumine et mitochondrial ont été calculées selon la méthode décrite dans (Matériel et Méthodes 4-2c).

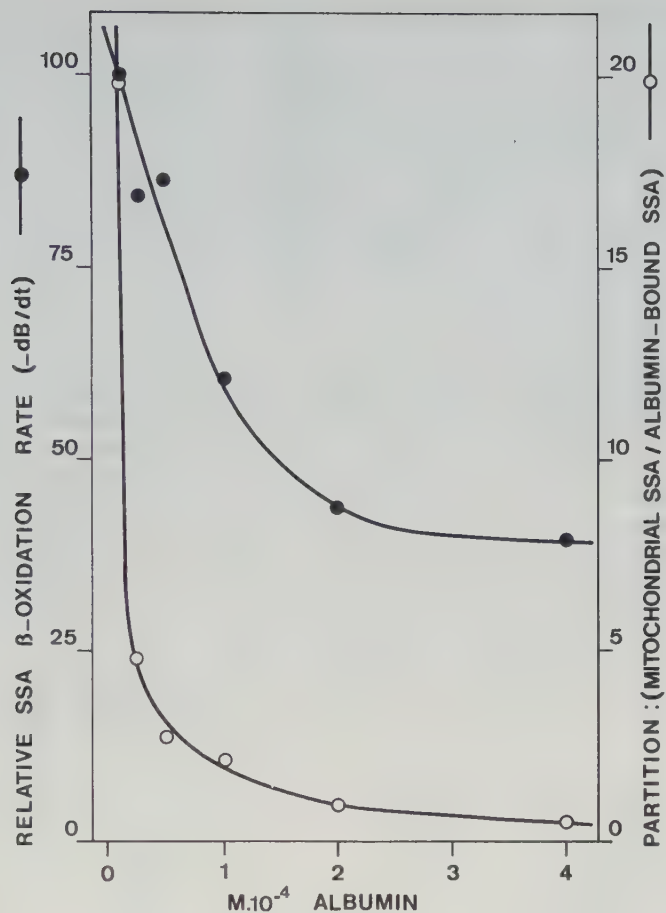


Fig. 18 : EFFET DE L'ALBUMINE SUR LA VITESSE DE β -OXYDATION DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" (SSA) ET SUR LA DISTRIBUTION P. La procédure expérimentale est celle décrite sous la Fig. 16. Les vitesses de β -oxydation (-dB/dt) ont été calculées à partir de la Fig. 16 et les partitions P définies par le rapport (contribution du signal du type mitochondrial en %/contribution du signal du type albumine en %) ont été obtenues à partir de la Fig. 17.

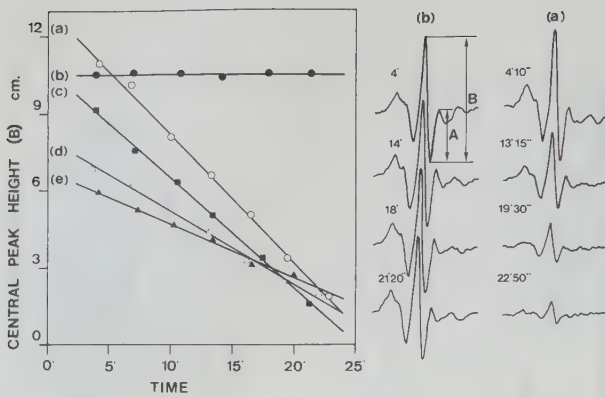


Fig. 19 : EFFET DE L'ALBUMINE SUR LA CINETIQUE DE β -OXYDATION DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" PREALABLEMENT INCORPORE DANS LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES. Les mitochondries (1 mgr/ml) en suspension dans la solution tampon contenant les cofacteurs, mais sans carnitine (Matériel et Méthodes 4-6) et contenant $0.5 \cdot 10^{-4}M$ d'acide stéarique "spin-labeled" lié à $0.5 \cdot 10^{-4}M$ d'albumine, ont été incubées 5' à $37^{\circ}C$; elles ont été ensuite centrifugées trois fois à 4000 g.av. dans le tampon à $4^{\circ}C$, puis resuspendues (4.83 mgr/ml) dans la solution tampon contenant les cofacteurs (pas de carnitine dans b) et pré-incubées pendant 1 h à $4^{\circ}C$. Ces opérations ont été suivies par des incubations à $37^{\circ}C$. (a) pas d'albumine; (b) pas d'albumine, pas de carnitine; (c) $0.125 \cdot 10^{-4}M$ d'albumine; (d) $1 \cdot 10^{-4}M$ d'albumine; (e) $2 \cdot 10^{-4}M$ d'albumine.

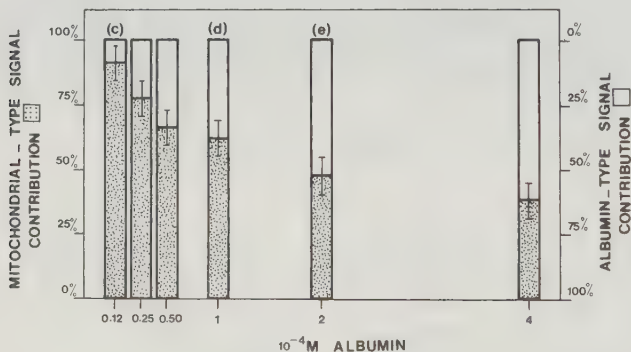


Fig. 20 : DISTRIBUTION DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN LABELED" ENTRE LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES ET L'ALBUMINE AU COURS DE LA CINETIQUE DE β -OXYDATION DE L'ACIDE GRAS, PREALABLEMENT LIE AUX MEMBRANES MITOCHONDRIALES. La procédure expérimentale a été décrite sous la Fig. 19. Les contributions des signaux de type albumine et mitochondrial ont été calculées selon la méthode décrite dans (Matériel et Méthodes 4-2c).

-1d-4 : Cinétique de β -oxydation de l'acide stéarique "spin-labeled" préalablement lié aux membranes mitochondriales.

Afin d'obtenir un signal pur, d'acide stéarique "spin-labeled" localisé dans les membranes mitochondriales (Fig. 19b), le complexe albumine-acide gras a été incubé 5' à 37°C en présence de mitochondries (mais en absence de carnitine pour empêcher la β -oxydation); puis l'albumine a été éliminée par trois centrifugations successives en renouvelant le tampon; les mitochondries ont été incubées ensuite dans le milieu requis pour la β -oxydation (Matériel et Méthodes 4-6).

En absence de carnitine (Fig. 19b), il n'y a aucune disparition de signal, donc pas de β -oxydation; en présence de carnitine, l'acide gras est β -oxydé à une vitesse constante selon la cinétique illustrée par la (Fig. 19a); l'addition d'albumine dans le milieu, ralentit considérablement les vitesses de β -oxydation (Fig. 19c-d-e)

Albumine	Vitesse relative de β -oxydation
0	100
0.125 . 10 ⁻⁴ M	87.1
0.25 . 10 ⁻⁴ M	85.3
0.50 . 10 ⁻⁴ M	65.4
1.0 . 10 ⁻⁴ M	57.2
2.0 . 10 ⁻⁴ M	41.5
4.0 . 10 ⁻⁴ M	36.0

La distribution (P) de l'acide gras entre l'albumine et les membranes mitochondriales reste constante au cours du temps pour une concentration donnée d'albumine (Fig. 20). Les vitesses de β -oxydation varient dans le même sens que (P); elles dépendent donc de la contribution du signal "membranes mitochondriales" (Fig. 21 et tableau page suivante).

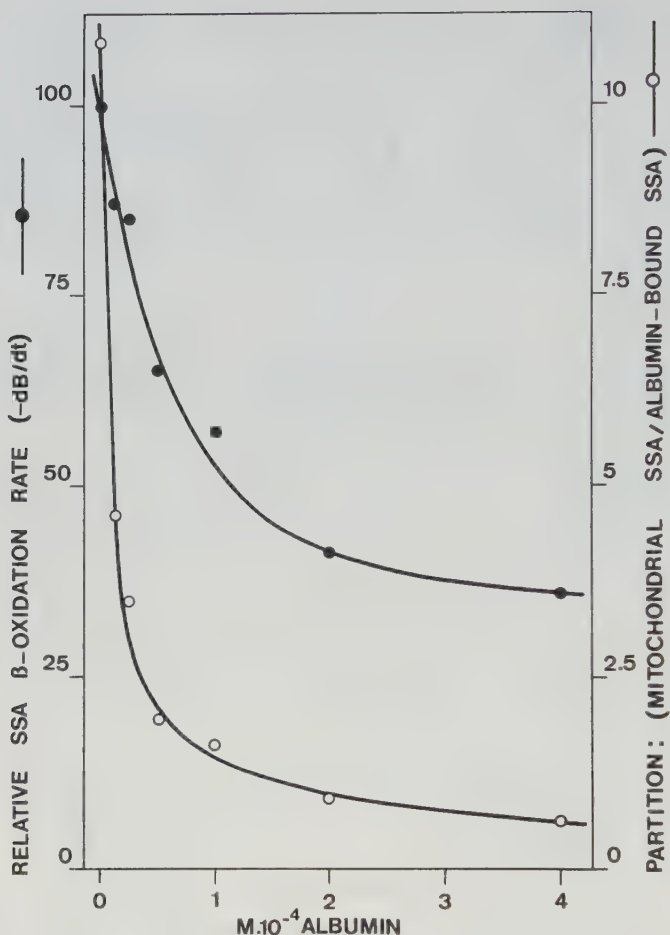


Fig. 21 : EFFET DE L'ALBUMINE SUR LA DISTRIBUTION (P) ET SUR LA VITESSE DE β -OXYDATION DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" (SSA) PREALABLEMENT INCORPORE DANS LES MEMBRANES MITOCHONDRIALES. La procédure expérimentale a été décrite sous la Fig. 19. Les vitesses de β -oxydation ($-dB/dt$) ont été calculées à partir de la Fig. 19 et les partitions (P) définies par le rapport (contribution du signal de type mitochondrial en %/contribution du signal albumine en %) ont été obtenues à partir de la Fig. 20.

	Y	X	X/Y	
Albumine	Contribution signal Albumine en %	Contribution signal mitochondrial en %	Distribution P	Vitesse relative de β -oxydation
0	8.45	91.55 $\pm$ 6.9	10.83	100
0.125 . 10 ⁻⁴ M	17.70	82.30 $\pm$ 5.9	4.65	87.1
0.25 . 10 ⁻⁴ M	22.15	77.85 $\pm$ 7.0	3.50	85.3
0.50 . 10 ⁻⁴ M	33.70	66.30 $\pm$ 6.9	1.96	65.4
1.0 . 10 ⁻⁴ M	38.00	62.00 $\pm$ 7.1	1.63	57.2
2.0 . 10 ⁻⁴ M	52.40	47.60 $\pm$ 7.3	0.90	41.5
4.0 . 10 ⁻⁴ M	61.40	38.60 $\pm$ 6.9	0.62	39.95

5-1e : CONCLUSIONS

L'acide stéarique "spin-labeled", en phase aqueuse, a un très grand degré de liberté de mouvement et le signal de RPE est du type isotrope avec une valeur de "splitting" hyperfin $2 A_{iso} = 31.4 \pm 0.4$ G (5-1b; Fig. 9a).

L'acide gras, peut se lier à l'albumine et devient fortement immobilisé, avec une valeur de $2T_{//} = 64 \pm 0.4$ G (5-1b; Fig. 9b).

Un transfert rapide d'acide gras entre l'albumine et les membranes mitochondriales a été observé et suit une cinétique à double palier (5-1c-3; Fig. 13), suggérant la saturation successive de deux compartiments qui pourraient bien être la membrane externe mitochondriale et la membrane interne. L'échange est réversible, l'équilibre étant régit par une valeur de distribution P qui dépend de la concentration en albumine (5-1c-4; Fig. 14).

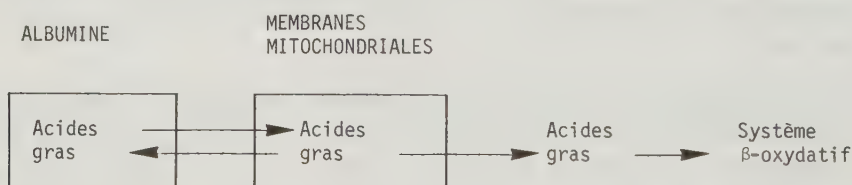
L'environnement de l'acide gras dans les membranes mitochondriales est essentiellement lipidique; l'index relatif de mobilité h'/h passe de 0.81 à 0.39, lorsque la phase lipidique est polymérisée par le tetroxyde d'osmium (5-1c-2; Fig. 11); cependant une certaine interaction avec des protéines est suggérée par la valeur h'/h qui passe de 0.81 à 0.96 lorsque les protéines membranaires sont fixées par le glutaraldehyde (5-1c-2; Fig. 11); dans ce cas la mobilité relative de l'acide gras est sensiblement identique à celle qu'il acquiert dans un environnement totalement lipidique (liposomes) où la valeur h'/h observée est de 0.98.

Une méthode a été décrite (5-1d-2) qui permet de stabiliser les signaux de RPE de l'acide stéarique "spin-labeled" en présence de mitochondries, de telle sorte que dans un milieu favorable, la disparition des signaux puisse être exclusivement attribuée à la β -oxydation. Les deux conditions suivantes doivent être appliquées : travailler avec des mitochondries structurellement intactes et les pré-incuber à 4°C dans un milieu contenant les cofacteurs (Matériel et Méthodes 4-6)

La cinétique de β -oxydation de l'acide stéarique "spin-labeled" est identique à celle de l'acide gras normal correspondant (5-1d-3; Fig. 15); la vitesse de β -oxydation mesurée par la variation ($-dB/dt$), dans laquelle B est la hauteur du pic central des signaux reste constante au cours du temps, impliquant une cinétique de β -oxydation linéaire (5-1d-3; Fig. 15).

Quelle que soit la localisation préalable des acides gras (liés à l'albumine ou incorporés dans les membranes mitochondriales), lors de l'incubation des mitochondries avec l'albumine et tout au long de la cinétique de β -oxydation, ils s'équilibrent entre ces deux compartiments suivant une distribution P (5-1d-3; Fig. 17) (5-1d-4; Fig. 20) définie par le rapport (contribution du signal mitochondrial/contribution du signal albumine exprimée en %); pour une quantité initiale fixe d'acide gras et d'albumine la valeur de P reste constante tout au long de la β -oxydation, ce qui explique que la forme des signaux de RPE ne varie pas, seule leur amplitude décroît. La valeur de P peut être modifiée en variant la concentration en albumine ; les vitesses de β -oxydation (5-1d-3; Fig. 16) (5-1d-4; Fig. 19) se modifient alors dans le même sens que P selon une fonction hyperbolique (5-1d-3; Fig. 19) (5-1d-4; Fig. 21).

Ces observations indiquent que le compartiment alimentant le système β -oxydatif en substrat (acides gras) est celui constitué par les membranes mitochondriales, le modèle opérationnel étant le suivant :



5-2 : EVIDENCES, IN VITRO, D'UN CONTRÔLE DU SYSTÈME β -OXYDATIF MITOCHONDRIAL, PAR DES PROTÉINES SE LIANT AUX ACIDES GRAS DANS LE COEUR DE RAT.

5-2a : INTRODUCTION

La mise en évidence, dans le chapitre précédent, d'un contrôle exercé sur le système β -oxydatif par l'albumine, utilisée en tant que transporteur d'acides gras, n'a d'intérêt que comme modèle, car physiologiquement l'albumine n'a pas accès au cytoplasme et se confine au système circulatoire.

Existe-t-il physiologiquement dans le cytoplasme des protéines transporteuses d'acides gras qui se comporteraient comme l'albumine dans le modèle ci-dessus, c'est-à-dire capable d'exercer un contrôle indirect et efficace sur la vitesse de la β -oxydation ?

Le surnageant obtenu après homogénéisation et centrifugation de tissus tels que le foie, la muqueuse intestinale, le muscle squelettique, le myocarde, le tissu adipeux et le rein (33,34), contient une fraction de protéines de faible poids moléculaire isolée par filtration à travers du Séphadex et capable de se lier aux acides gras. A partir de cette fraction isolée du foie (8) et de la muqueuse intestinale (9) une protéine d'environ 12'000 daltons de poids moléculaire a été purifiée. En plus de sa capacité de se lier aux acides gras, il a été reporté que cette protéine était impliquée dans les processus d'estérification du glycérol (35-38) et dans le contrôle de la synthèse des acides gras (39). Son mode d'action n'est cependant pas connu.

Le présent chapitre concerne la purification de cette protéine (FABP) pour la première fois à partir du myocarde et la mise en évidence d'une nouvelle fonction comme transporteur d'acide gras alimentant et modulant indirectement le système β -oxydatif mitochondrial.

5-2b : DETECTION DE PROTÉINES SE LIANT AUX ACIDES GRAS, DANS LE SURNAGEANT DE COEUR DE RAT.

Le surnageant de coeur de rat préparé et traité selon (Matériel et Méthodes : 4-8; 4-9) se résout en deux pics (A, B) de protéines après filtration sur Séphadex G 75 (Fig. 22). Le pic A est centré sur des protéines de poids moléculaire voisin de celui de l'albumine, tandis que le pic B correspond à des poids moléculaires plus petits que 25'000 daltons.

L'addition d'acide stéarique (1-C^{14}) au surnageant, permet de détecter 3 pics d'activité spécifique (cpm/mgr prot.) dont deux correspondent au pic de protéines A et le troisième est centré sur le pic B (Fig. 22).

Sur une même colonne et dans des conditions identiques, lorsque de l'acide stéarique (1-C^{14}) est déposé en absence de surnageant, aucune radio-activité n'apparaît dans les fractions collectées. Il en résulte que l'acide gras "co-éluant" avec les pics A et B pourraient très bien être liés à des protéines. Cette liaison a été visualisée par l'al-

lure caractéristique du spectre de RPE de l'acide gras co-élué avec les protéines du pic B. L'écartement des pics extrêmes du signal de RPE (fig. 23a) augmente considérablement en présence des protéines du pic B. (Fig. 23b-f); la forme du signal résultant est caractéristique d'une forte immobilisation de la molécule d'acides gras par liaison aux protéines. Lorsque les sites de liaison sont saturés (Fig. 23f), il y a superposition de deux signaux, l'un représentatif de l'acide gras en mouvement isotrope dans le milieu et l'autre représentatif de l'acide gras fixé aux protéines.

5-2C : PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA PROTEINE (FABP) SE LIANT AUX ACIDES GRAS DANS LE PIC B.

Le pic B (fig. 22), contient 6 protéines (Fig. 24a1-a2; Fig. 25-1) dont certaines et en particulier la myoglobine, après traitement avec de la cellulose DE 52 (Matériel et Méthodes 4-10) ne sont pas retenues sur l'échangeur à pH 8:3 (Fig. 26a); celles qui y sont retenues peuvent être éluées par un gradient de KCl et sont résolues en 3 pics de protéines : I; II; III; (Fig. 26b). Le pic II, dans sa partie centrale, ne contient qu'une seule protéine nommée FABP, de poids moléculaire d'environ 12'000 daltons (Fig. 24-b7) et de pI égal à 5.0 (Fig. 25-2).

L'acide stéarique ($1-C^{14}$), lié aux protéines du pic B (fig. 22), co-élué avec la protéine FABP dans le gradient de KCl (pic II, Fig. 26b).

La liaison de l'acide gras à la protéine pure a pu être mise en évidence par "spin-labeling", car l'acide stéarique "spin-labeled" co-élué également avec la protéine FABP ainsi qu'en témoigne le signal de RPE résultant (Fig. 27 b); ce dernier est remarquablement différent quant à sa forme (largeur de raies, rapport d'amplitude des pics) du signal de RPE témoins, obtenu en mettant de l'acide stéarique "spin-labeled" dans le même milieu, mais en absence de la protéine (Fig. 27a). L'élargissement des raies (Fig. 27b) traduit une perte de mobilité de la chaîne d'acides gras, par liaison à la protéine FABP.

5-2d : CINETIQUE DE β -OXYDATION DES ACIDES GRAS LIES A LA PROTEINE FABP.

Après addition d'acide stéarique ($1-C^{14}$) au surnageant puis filtration sur Séphadex G 75 et sur cellulose DE 52, le complexe pur FABP/acide gras a été ajouté à un milieu contenant des mitochondries cardiaques isolées ainsi que les cofacteurs nécessaires à la β -oxydation (Matériel et Méthodes 4-6). Après incubation à 37°C, l'analyse de la disparition de la radio-activité a mis en évidence la β -oxydation virtuellement totale de l'acide stéarique fixé à la protéine FABP (Fig. 28) selon une cinétique très rapide puisqu'après 5', 79 % de la quantité initiale d'acide stéarique a été catabolisé. Un temps de latence très court (environ 15") précède cette cinétique rapide et pourrait être indicatif de l'équilibration préalable de l'acide gras entre la protéine et les membranes mitochondriales.

La vitesse initiale de β -oxydation (Fig. 29) de l'acide stéarique ($1-C^{14}$) lié à la protéine FABP dans le pic B (Fig. 22) est modulée par la concentration en protéines; la courbe des vitesses passe par un maximum, puis décroît lorsque la concentration en protéines croît (Fig. 29).

5-2e : CONCLUSIONS

De nombreux tissus contiennent une protéine de faible poids moléculaire (environ 12'000 daltons), capable de se lier aux acides gras. Elle a été purifiée à partir du foie (8) et de la muqueuse intestinale (9). Sa fonction physiologique est restée hypothétique (9,40).

Ce chapitre a concerné la purification de cette protéine, pour la première fois à partir du muscle cardiaque, après filtration du surnageant sur Séphadex G 75 (5-2b; Fig. 22), puis chromatographie à travers un échangeur d'anions : cellulose DE 52 (5-2c; Fig. 26). La pureté de la protéine a été vérifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (5-2c; Fig. 24) et par "isoelectric-focusing" (5-2c; Fig. 25); elle a un poids moléculaire d'environ 12'000 daltons et un pI de 5.0.

La réelle liaison des acides gras à la protéine a été visualisée par "spin-labeling" (5-2b; Fig. 23) (5-2c; Fig. 27).

Une nouvelle fonction a été décrite pour cette protéine comme transporteur capable de céder les acides gras au système β -oxydatif mitochondrial (5-2d; Fig. 28).

L'analyse de la cinétique de β -oxydation de l'acide stéarique en présence de cette protéine (5-2d; Fig. 29), suggère un contrôle de la vitesse de β -oxydation selon le modèle décrit dans un chapitre précédent (5-1d) avec l'albumine comme transporteur d'acides gras.

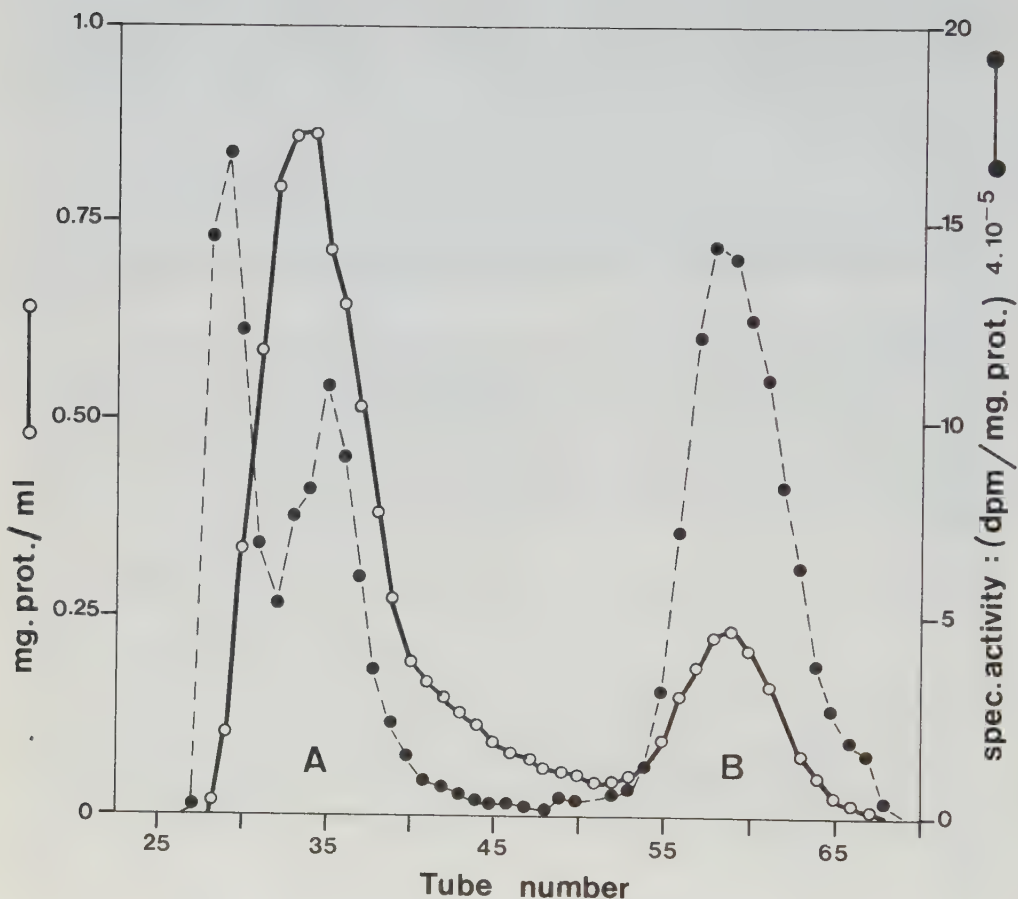


Fig. 22 : FILTRATION DU SURNAGEANT DE COEUR DE RAT A TRAVERS UN GEL DE SEPHADEX G 75. 5 ml de surnageant (Matériel et Méthodes 4-8; 4-9) contenant 40 mgr de protéines et 0.5 ml d'acide stéarique ($1\text{-}^{14}\text{C}$; $5.55\mu\text{Ci}$) sous forme de sel potassique, après dépôt à la surface du gel (37×490 mm) ont été élués par un tampon contenant 0.005 M de phosphate de sodium (pH.7.4). Volume par tube : 5.28 ml.

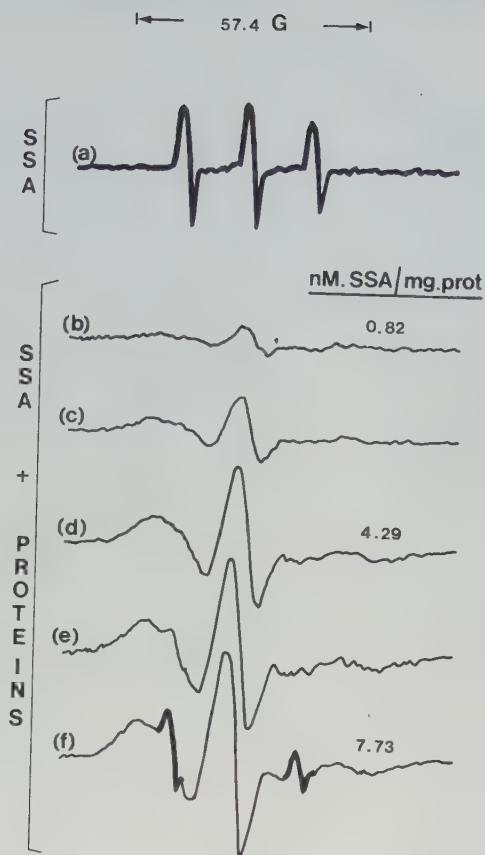


Fig. 23 : VISUALISATION PAR (RPE) DE LA LIAISON DE L'ACIDE STEARIQUE "SPIN-LABELED" (SSA) AUX PROTEINES DU PIC B.
 (a) acide stéarique "spin-labeled" en position C_{12} , sous forme de sel potassique ($0.14 \cdot 10^{-4} M$) dans $0.005 M$ tampon phosphate de sodium (pH.7.4)
 (b-f), l'acide stéarique "spin-labeled" a été ajouté aux protéines du pic B (Fig. 22) dans les rapports (nM SSA/mgr prot B) suivants : (b) 0.82; (d) 4.29; (f) 7.73. Les signaux de RPE ont été obtenus à $37^{\circ}C$.

(a) Tris-HCL

(b) SDS

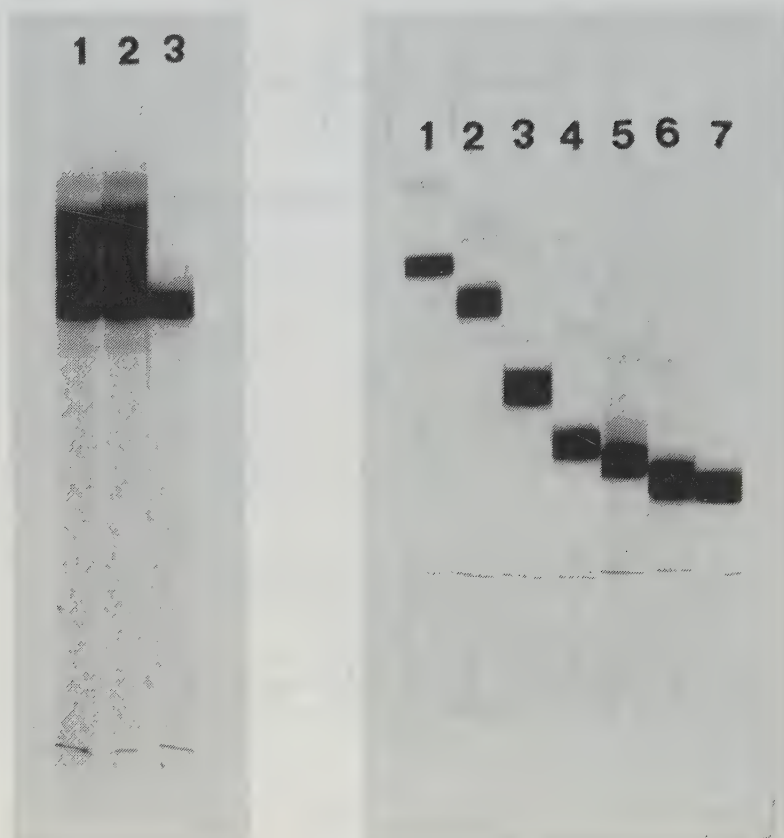


Fig. 24 : ELECTROPHORESE DE PROTEINES SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE.

(a) GELS TRIS-HCL : (gel 1) : 54 μ gr de protéines de la partie centrale (tube 57, 58, 59, 60) du pic B (Fig. 22) dans 0.01 M Tris-acide phosphorique (pH.6.3); (gel 2) : comme pour gel 1, mais 56 μ gr; (gel 3) : 40 μ gr de protéine de la partie centrale (tube 27, 28, 29) du pic II (Fig. 26) dans 0.01 M Tris-acide phosphorique (pH.6.3).

(b) GELS SDS : (gels 1-6) : 20 μ gr protéines/gel, respectivement (1) : albumine sérique de boeuf; (2) : ovalbumine; (3) : chymotrypsinogène; (4) : myoglobine; (5) : ribonucléase pancréatique; (6) cytochrome c, dans 0.01 M Tris-acide phosphorique (pH.6.3); (gel 7) comme gel 3 (Fig. 24 a) mais 23 μ gr de protéine.

Les conditions de migration et de coloration ont été décrites dans (Matériel et Méthodes 4-11).

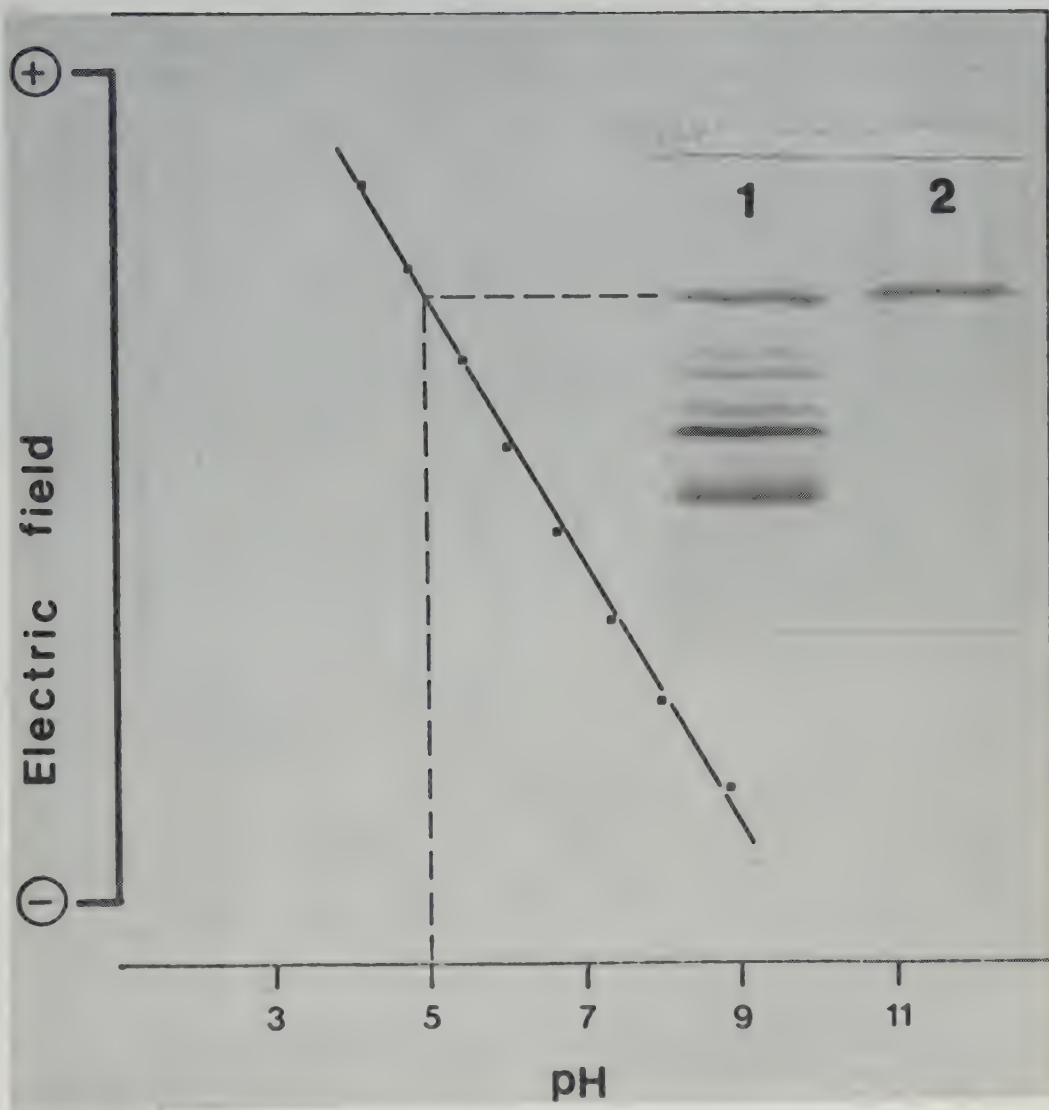


Fig. 25 : DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE (pI) PAR "ISOELECTRIC FOCUSING"
 (1) 54 μ gr de protéines de la partie centrale (tube 57, 58, 59, 60) du pic B (Fig. 22) dans 0.01 M Tris-acide phosphorique (pH 8.3);
 (2) 17 μ gr de protéine de la partie centrale (tube 27, 28, 29) du pic II (Fig. 26), dans 0.01 M Tris-acide phosphorique (pH.6.3). Les autres conditions expérimentales ont été données dans (Matériel et Méthodes 4-12).

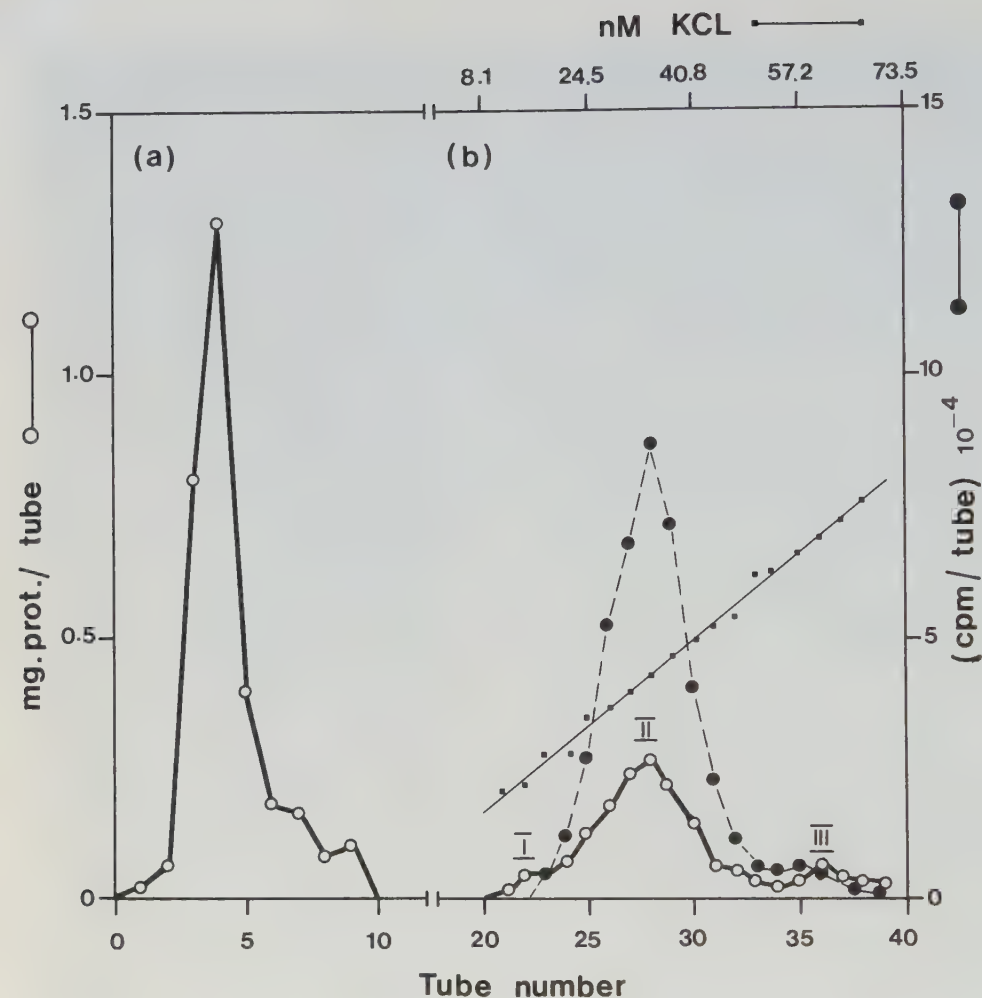
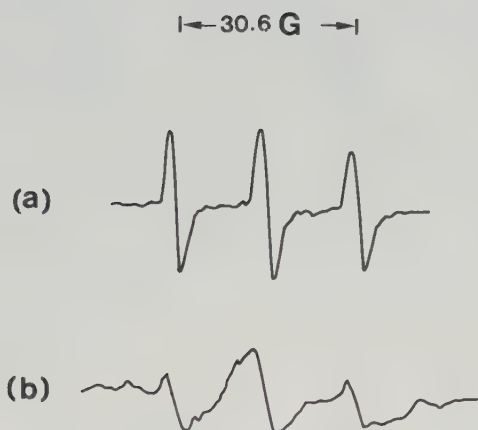


Fig. 26 : PURIFICATION DE LA PROTEINE (FABP) PAR CHROMATOGRAPHIE SUR CELLULOSE DE52. 6.28 mgr de protéines de la partie centrale (tube 57, 58, 59, 60) du pic B (Fig. 22) contenant de l'acide stéarique ($1\text{-}^{14}\text{C}$; $2.2 \cdot 10^6$ dpm), ont été traités avec de la cellulose DE52 comme décrit dans (Matériel et Méthodes 4-10).
 (a) élution avec 0.01 M Tris-acide phosphorique (pH.8.3); volume par tube : 5.68 ml
 (b) élution avec un gradient linéaire de KCl dans 0.01 M Tris-acide phosphorique (pH.6.3); volume par tube : 1.63 ml.



ig. 27 : VISUALISATION DE LA LIAISON DE L'ACIDE STÉARIQUE "SPIN-LABELED" A LA PROTEINE (FABP), PAR (RPE)

(a) $4.9 \cdot 10^{-6} \text{M}$ acide stéarique "spin-labeled" en position C_{12} , sous forme de sel potassique, dans $7.9 \cdot 10^{-3} \text{M}$ de tampon phosphate de sodium (pH.7.4) contenant $3.97 \cdot 10^{-4} \text{M}$ EDTA, $6.7 \cdot 10^{-2} \text{M}$ KCl et 0.1 M saccharose

(b) 32 nM d'acide stéarique "spin-labeled" en position C_{12} , sous forme de sel potassique, ont été mélangées à 4.21 mgr de protéines de la partie centrale (tube 57, 58, 59, 60) du pic B (Fig. 22) et éluées de la colonne de cellulose DE 52 comme décrit dans (Matériel et Méthodes 4-10); puis la partie centrale (tube 27, 28, 29) du pic II (Fig. 26) a été concentrée et transférée dans un tampon contenant $7.9 \cdot 10^{-3} \text{M}$ phosphate de sodium (pH.7.4) et contenant également EDTA, KCL, saccharose, comme indiqué sous Fig. 27a. Les spectres de RPE ont été obtenus à 37°C .

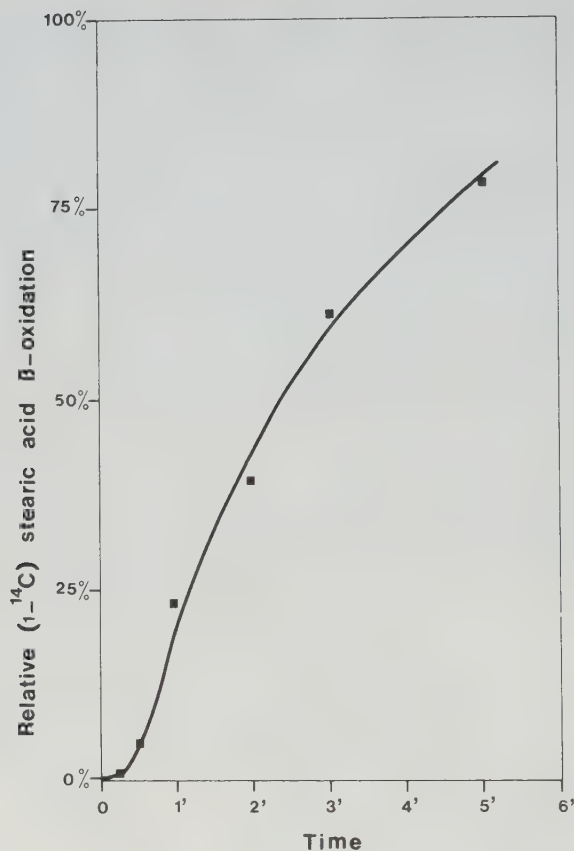


Fig. 28 : CINETIQUE DE LA β -OXYDATION DE L'ACIDE STÉARIQUE LIÉ À LA PROTÉINE (FABP). Les incubations ont été effectuées à 37°C dans le milieu décrit dans (Matériel et Méthodes 4-6) et contenant en plus : 2,87 mgr de protéines (mitochondries) par ml, 0.166 mgr FABP/ml liée à de l'acide stéarique ($1\text{-}^{14}\text{C}$; 1.10^5 dpm/mgr FABP). Ce complexe acide stéarique - FABP a été obtenu par les deux étapes décrites successivement sous la Fig. 22 et la Fig. 26. La β -oxydation a été mesurée selon la méthode décrite dans (Matériel et Méthode 4-7a).

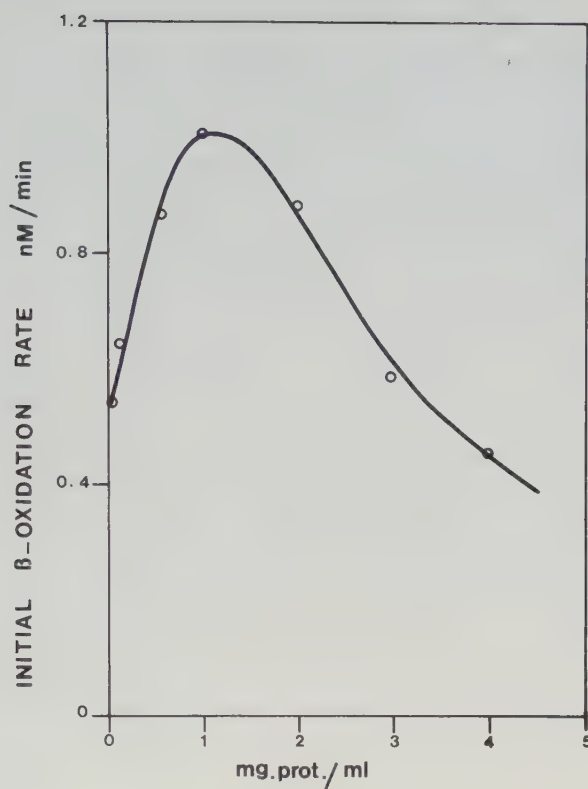


Fig. 29 : CONTROLE DE LA VITESSE DE β -OXYDATION DE L'ACIDE STEARIQUE LIE AUX PROTEINES DU PIC (B). Les incubations ont été réalisées à 37°C dans le milieu décrit dans (Matériel et Méthodes 4-6) contenant : des mitochondries (3.08 mgr/ml), 1.10^{-4} M acide stéarique ($1\text{-}^{14}\text{C}$; $2.6.10^6$ dpm) et des concentrations variables de protéines du pic B (Fig. 22). La β -oxydation a été mesurée après 3' d'incubation, selon la procédure décrite dans (Matériel et Méthodes 4-7a).

6 - DISCUSSION

6 - DISCUSSION

Le surnageant obtenu après homogénéisation de tissus très divers tels le foie, le coeur, la muqueuse intestinale, le rein, le tissu adipeux, contient plusieurs protéines capables de se lier aux acides gras. L'une d'elle a été particulièrement étudiée durant ces dix dernières années. Elle n'a été purifiée totalement qu'à partir du foie (protéine Z; réf. 8), de la muqueuse intestinale (protéine FABP; réf. 9) et du coeur (présent travail). La réelle fonction physiologique de cette protéine, analysée depuis plusieurs années par Ockner et coll. (9), est demeurée hypothétique. Des auteurs, tels Mishkin et coll., très spécialisés dans l'étude de la protéine Z du foie, concluent leur publication (38) en restant très général : "... These observations constitute direct evidence for the possible role of Z protein in the fatty acid metabolism.". D'autres, tels Suzue et coll., concluent en disant (40) : "... In consequence the physiological role of these fatty acid binding fractions is not yet elucidated". Depuis trois ans, plusieurs publications ont décrit la participation de cette protéine dans les estérifications du glycérol en présence de microsomes (35-38) et son rôle régulateur dans la synthèse des acides gras où elle module l'effet de feed-back négatif exercés par les acyl-CoA sur l'acétyl-CoA carboxylase (39). Cependant, aucune hypothèse n'a été publiée quant au mode d'action de cette protéine.

Dans notre optique, étant donné que la propriété physiologique fondamentale de cette protéine est de pouvoir se lier aux acides gras, le problème de son mécanisme d'action ne peut être abordé efficacement que par des techniques qui donnent des informations sur la liaison particulière de type hydrophobique entre la protéine et son ligand (acide gras). Actuellement la méthode de "spin-labeling" est la plus efficace. Nous l'avons utilisée dans la présente étude pour mettre en évidence un mécanisme d'action nouveau pour cette protéine dans le coeur. Au préalable nous avons élucidé le mécanisme du contrôle de la concentration en albumine sur la vitesse de β -oxydation des acides gras par les mitochondries cardiaques isolées. Nous n'avons considéré ce transporteur d'acides gras que comme un modèle étant donné que dans l'organisme il n'est jamais en contact avec des mitochondries, l'albumine restant confinée dans le système circulatoire. Un ligand, dérivé "spin-labeled" de l'acide stéarique a été pour la première fois utilisé comme substrat indicatif de la cinétique de β -oxydation à l'égal d'un acide gras normal, grâce à une méthode efficace de stabilisation du radical nitroxyde $>NO\cdot$ à l'égard d'oxydo-réduction par tout autre système enzymatique, à l'exclusion du système β -oxydatif. La double information, d'une part cinétique et d'autre part physico-chimique contenue dans les signaux de RPE, nous a permis de démontrer que les acides gras sont réversiblement échangés entre le transporteur d'acide gras (l'albumine) et la phase lipidique des membranes mitochondriales; ce dernier compartiment constitue un réservoir qui alimente en substrat (acides gras) le système β -oxydatif. La vitesse de la β -oxydation dépend du contenu de ce réservoir.

voir en acides gras; elle est conditionnée en chaque instant par la distribution des acides gras entre ce réservoir mitochondrial et le transporteur externe (albumine) selon un équilibre constant au cours du temps et qui ne dépend que des concentrations initiales de mitochondries et d'albumine. La suite de ce présent travail a concerné une étude préliminaire en vue de transposer les résultats ci-dessus à un réel transporteur d'acides gras intra-cytoplasmique. Pour la première fois, une protéine cytoplasmique a été purifiée à partir du coeur pour être utilisée comme véhicule d'acides gras alimentant le système β -oxydatif mitochondrial. La modulation de la vitesse de β -oxydation obtenue en variant la concentration de cette protéine, suggère une interaction avec les membranes mitochondriales du même type que celle de l'albumine. Ses caractéristiques, telles que pI 5.0, poids moléculaire 12.000 daltons l'apparente à la protéine Z isolée du foie (8) et à la protéine FABP isolée de la muqueuse intestinale (9).

En considérant les données actuelles, une propriété semble caractériser cette protéine de faible poids moléculaire, capable de se lier aux acides gras, c'est sa participation à des processus enzymatiques liés à des membranes (estérifications microsomiales, β -oxydation mitochondriale). Nous suggérons que la fonction de cette protéine serait de distribuer les acides gras entre des réservoirs intra-membranaires (phase lipidique) et ses propres sites de liaison et de contrôler par l'intermédiaire de facteurs de partition la quantité réelle de substrat (acides gras) ayant accès à ces réservoirs, autrement dit de pouvoir contrôler la vitesse de réactions enzymatiques (β -oxydation, estérifications) liées à ces membranes.

Ce nouveau paramètre de régulation pourrait être extrêmement important dans le coeur où les acides gras catabolisés par le système β -oxydatif constituent la principale source d'énergie. Du point de vue physiologique, nous pouvons prévoir que tous les facteurs qui augmentent la concentration locale en mitochondries à l'intérieur de la cellule, favorisent la vitesse de la β -oxydation en déplaçant l'équilibre des acides gras dans le sens mitochondrial. Il est probable que la disposition anisotrope localement concentrée des mitochondries dans le coeur suit ce principe en vue d'optimiser la β -oxydation. Nous pouvons prévoir, d'autre part, que la vitesse de la β -oxydation peut être contrôlée indirectement par tous les facteurs altérant la concentration en transporteur d'acides gras. Physiologiquement cette éventualité est fort probable puisque la concentration en protéine FABP isolée de la muqueuse intestinale est modifiée par des variables tels le régime alimentaire ou le diabète (9). Il est également prévisible que des facteurs (ligands) qui pourraient modifier l'affinité de la protéine pour les acides gras, vont modifier les caractéristiques de l'équilibre des acides gras entre la phase lipidique des membranes mitochondriales et le transporteur cytoplasmique, agissant ainsi efficacement et indirectement sur la vitesse de production d'énergie par le système β -oxydatif. Cette éventualité est également hautement probable et présente un grand intérêt si l'on considère le grand nombre d'effecteurs capables d'altérer la liaison des acides gras à un transporteur modèle tel que l'albumine.

7 - BIBLIOGRAPHIE

7 - BIBLIOGRAPHIE

- (1) Neely, J.R., Morgan, H.E. (1974) *Ann. Rev. of Physiol.* 36, 413-459. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle.
- (2) Neely, J.R., Bowman, R.H., Morgan, H.E. (1969) *Am. J. Physiol.* 216, 804-811. Effects of ventricular pressure development and palmitate on glucose transport.
- (3) Williamson, J.R. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2308-2321. Glycolytic control mechanisms. I. Inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in the isolated perfused rat heart.
- (4) Randle, P.J. et al (1966) *Rec. Progr. Horm. Res.* 22, 1-44,. Interaction of metabolism and the physiological role of insulin.
- (5) Bowman, R.H. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 3041-3048. Effects of diabetes, fatty acids and ketone bodies on tricarboxylic acid cycle metabolism in the perfused rat heart.
- (6) Garland, P.B., Randle, P.J., Newsholme, E.A. (1963) *Nature* 200, 169-170. Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation.
- (7) Morgan, H.E., Randle, P.J., Regen, D.M. (1959) *Biochem. J.* 73, 573-579. Regulation of glucose uptake by muscle. 3. The effects of insulin, anoxia, salicylate and 2-4 dinitrophenol on membrane transport and intracellular phosphorylation of glucose in the isolated rat heart.
- (8) Warner, M. et Neims, A.H. (1975) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 53, 493-500. Studies on Z fraction. I. Isolation and partial characterization of low molecular weight ligand-binding protein from rat hepatic cytosol.
- (9) Ockner, R.K. et Manning, J.A. (1974) *The J. of Clin. Invest.* 54, 326-338. Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation and evidence for its role in cellular fatty acid transport.
- (10) Levitsky, D.O. et Skulachev, V.P. (1972) *Biochim. Biophys.* 275, 33-50. Carnitine : the carrier transporting fatty acyls into mitochondria by means of an electrochemical gradient of H^+ .
- (11) Oram, J.F., Bennetch, S.L. et Neely, J.R. (1973) *The J. of Biol. Chem.* 248, 5299-5309. Regulation of fatty acid utilization in isolated perfused rat hearts.
- (12) Fritz, I.B. (1959) *Am. J. of Physiol.* 197, 297-304. Action of carnitine on long chain fatty acid oxidation by liver.
- (13) Fritz, I.B. et McEwen, B. (1959) *Science* 129, 334. Effects of carnitine on fatty-acid oxidation by muscle.

- (14) Fritz, I.B. (1963) *Advances in lipid research* 1, 285-334 Carnitine and its role in fatty acid metabolism.
- (15) Björntorp, P., Ells, A.H. et Bradford, R.H. (1964) *The J. of Biol. Chem.* 239, 339-344. Albumin antagonism of fatty acid effects on oxidation and phosphorylation reactions in rat liver mitochondria.
- (16) Björntorp, P. (1966) *The J. of Biol. Chem.* 241, 1537-1543 The oxidation of fatty acids combined with albumin by isolated rat liver mitochondria.
- (17) Passeron, S., Savagean, M.A. et Harary, I. (1968) *Arch. of Biochem. and Biophys.* 128, 124-128. Optimal conditions for palmitate oxidation by rat heart homogenates.
- (18) Lopes-Cardozo, M. et Van des Bergh, S.G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 357, 43-52. Ketogenesis in isolated rat liver mitochondria. II. Factors affecting the rate of β -oxidation.
- (19) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- (20) Fritz, I.B. and Yue, K.T.N. (1963) *J. Lip. Res.* 4, 279-288 Long-chain carnitine acyl-transferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine.
- (21) Fritz, I.B. (1964) *Am. J. Physiol.* 206, 1217-1222. Carnitine effects on palmitate - 1-C^{14} conversion to CO_2 and glycerides by various tissues.
- (22) Morton R.K. (1955) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. and Kaplan, N.O., eds.), Vol. 1, p. 45, Academic Press, New-York.
- (23) Davis, B.J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 104-110.
- (24) Weber, K. and Osborn, M. (1969) *The J. of Biol. Chem* 244, 4406-4412. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis.
- (25) Malik, N. and Berle, A. (1972) *Analyt. Biochem.* 49, 173-176. New stain fixative for proteins separated by gel isoelectric focusing based on Coomassie Brilliant Blue.
- (26) Luft, J.H., (1961) *J. Biophys. and Biochem. Cytology* 9,409-441 Improvements in epoxy resin embedding methods.
- (27) Teresi, J.D. and Luck, J.M. (1952) *The J. Biol. Chem.* 194, 823-834. The combination of organic anions with serum albumin, VIII. Fatty acid salts.
- (28) Goodman, D.S. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* 80, 3892-3898 The interaction of human serum albumin with long-chain fatty acid anions.
- (29) Spector, A.A. (1975) *J. of. Lip. Res.* 16, 165-179. Fatty acid binding to plasma albumin.

- (30) Knoop, F. (1904) Beitr. Chem. Physiol. Pathol. 6, 150-162 Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper.
- (31) Weinhouse, S., Medes, G. et Floyd, N.F. (1944) J. Biol. Chem. 155, 143-151. Fatty acid metabolism. The mechanism of ketone body synthesis from fatty acids, with isotopic carbon as tracer.
- (32) Keith, A.D., Waggoner, A.S. et Griffith, O.H. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. US. 61, 819-826. Spin-labeled mitochondrial lipids in *Neurospora crassa*.
- (33) Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B. et Ho, W.K.L. (1972) Science, 177, 56-58. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues.
- (34) Mishkin, S., Stein, L., Gatmaitan, Z. et Arias, I.M. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 997-1003. The binding of fatty acids to cytoplasmic proteins : Binding to Z protein in liver and other tissues of the rat.
- (35) O'Doherty, P.J.A. et Kuksis, A. (1975) FEBBS Letters, 60, 256-258. Stimulation of triacylglycerol synthesis by Z protein in rat liver and intestinal mucosa.
- (36) Mishkin, S., Stein, L., Fleischner, G., Gatmaitan, Z. et Arias, I.M. (1975) Am. J. of Physiol. 228, 1634-1640. Z protein in hepatic uptake and esterification of long-chain fatty acids.
- (37) Ockner, R.K. et Manning, J.A. (1976) The J. of Clin. Invest. 58, 632-641. Fatty acid binding protein. Role in esterification of absorbed long chain fatty acid in rat intestine.
- (38) Mishkin, S. et Turcotte, R. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 376-381. Stimulation of monoacylglycerophosphate formation by Z protein.
- (39) Lunzer, M.R., Manning, J.A. et Ockner, R.K. (1976) Clin. Res 24 : 287 A. Long chain acyl-CoA inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase (ACC) : Modulation by cytoplasmic proteins.
- (40) Suzue, G. et Marcel, Y.L. (1975) Can. J. Biochem. 53, 804-809. Studies on the fatty acid binding proteins in cytosol of rat liver.

